Bafilomycine
Sekundärmetabolite aus Streptomyces griseus mit fungizider und insektizider Wirkung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Angelika Baumgartner
aus Heiningen

1985

DEUTSCHES LEDER-MUSEUM

BAFILOMYCINE

SEKUNDÄRMETABOLITE AUS STREPTOMYCES GRISEUS MIT FUNGIZIDER UND INSEKTIZIDER WIRKUNG

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Angelika Baumgartner
aus Heiningen

1985

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Januar 1985

Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Reinhard

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Anregungen und die großzügige Unterstützung danke ich Herrn Professor Dr. H. Zähner herzlich.

Herrn Professor Dr. H. Hagenmaier, Organisch-chemisches Institut der Universität Tübingen, danke ich für die Bereitstellung der HPLC-Anlage.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn M. Deeg, Organisch-chemisches Institut der Universität Tübingen, für die Reinigung der Antibiotika und für seine Hilfe bei der Einarbeitung in die HPLC-Analytik.

Herrn D. Neubauer und Herrn J. Sauerbier, Institut für Mikrobiologie I, danke ich für die Durchführung der 100 l- und 200 l-Fermentationen.

Herrn K. Wusch möchte ich für das Zeichnen der Abbildungen danken.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien 6
1.1. Nährlösungsbestandteile 6
1.2. Chemikalien für Verfütterungsexperimente 6
1.3. Chemikalien für Fermentation und Aufarbeitung 7
1.4. Chemikalien für biologische Tests 7

2. Nährmedien 8

3. Mikroorganismen 11
3.1. Bafilomycinproduzenten 11
3.2. Teststämme 11

4. Gewinnung und Charakterisierung von Mutanten 14
4.1. Herstellung einer Sporensuspension 14
4.2. Gewinnung von Mutanten durch NTG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin)-Mutagenese 14
4.3. Charakterisierung von Mutanten 15

5. Methoden zur Herstellung der Antibiotika 15
5.1. Schüttelkolbenversuche 15
5.2. Fermentation 16
5.3. Fermentationsanalyse 17
5.4. Isolierung und Reinigung der Antibiotika 18

6. Optimierung der Bafilomycinproduktion und Verfütterungsexperimente 19
6.1. Nährmedien 19

6.2. C-Quellen-Test 19
6.3. Belüftung 19
6.4. Temperaturgradient 20
6.5. pH-Wert 20
6.6. Verfütterungen 20

7. Methoden zur chemischen und physikalischen Charakterisierung 21
7.1. Dünnschichtchromatographie 21
7.2. HPLC 21

8. Methoden zur biologischen Charakterisierung 22
8.1. Plattendiffusionstest 22
8.2. Bioautographie 23

9. Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise 23
9.1. Streifengradiententest 23
9.2. Messung an Lipidvesikeln 23
9.3. Test an der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere 24
9.4. Test an der K^+-ATPase aus E. coli 25

III. ERGEBNISSE 28

1. Beschreibung der Produzentenstämme 28
1.1. Nomenklatur 28
1.2. Wachstumsverhalten 28

2. Mutanten von Tü 2437 29
2.1. NTG-Mutagenese 29
2.2. Auxotrophe Mutanten 30
2.3. Mutanten mit verändertem Bafilomycinmuster 31

3. Optimierung der Bafilomycinproduktion 32
3.1. Nährmedien 32

3.2. C-Quellentest 33
3.3. Belüftung 35
3.4. Temperaturgradient 35
3.5. pH-Wert 35
3.6. Zugabe von Sojaöl 36
3.7. Verfütterung von Vorstufen 37

4. Herstellung der Antibiotika 39
4.1. Herstellung in Schüttelkolben 39
4.2. Fermentation 41
4.3. Aufarbeitung und Reinigung 41
4.4. Bilanzierung 43

5. Physikalisch-chemische Charakterisierung 45
5.1. Dünnschichtchromatographie 45
5.2. HPLC 46

6. Biologische Charakterisierung 47
6.1. Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Bafilomycinkonzentration 47
6.2. Wirkungsspektrum 48
6.3. Morphologische Veränderungen 50

7. Suche nach modifizierten Bafilomycinen 51
7.1. Verzweigtkettige Aminosäuren 51
7.2. Dicarbonsäuren 52
7.3. Methionin-Antagonisten 54
7.4. p-Aminobenzoesäureanaloga 55
7.5. Folsäureantagonisten 57

8. Bafilomycin L 57
8.1. Herstellung von Bafilomycin L 57
8.2. Reinigung und Isolierung 58
8.3. Physikalisch-chemische Charakterisierung 58
8.4. Biologische Charakterisierung 60

9. Untersuchungen zur Wirkungsweise 61
9.1. Streifengradiententest 61
9.2. Wirkung der Antibiotika auf Liposomen 62

9.3. Wirkung der Antibiotika auf die Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere 66

9.4. Wirkung der Antibiotika auf die K^+-ATPase aus E. coli 66

IV. DISKUSSION 69

1. Biosynthese von Makroliden 69

2. Verwandte Makrolide und deren biologische Wirkung 73

3. Optimierung der Bafilomycinproduktion 76

4. Biologische Variation des Bafilomycin-moleküls 78

5. Wirkung der Bafilomycine auf Liposomen 83

6. Wirkung der Bafilomycine auf die Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere 85

7. Wirkung der Bafilomycine auf die K^+-ATPase aus E. coli 86

V. ZUSAMMENFASSUNG 88

VI. LITERATUR 90

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ade	Adenin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville Md., USA
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase
BV	Bettvolumen
CBS	Central bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlor-phenylhydrazon
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Berlin, Göttingen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Ethylacetat
ETH	Stammsammlung des Instituts für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, Schweiz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
MES	Morpholinoethansulfonsäure
met	Methionin
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Na-dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
thr	Threonin
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tü	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Tübingen

ura	Uracil
UV	ultraviolett
val	Valin
v/v	Verhältnis von Volumenteilen
w/w	Verhältnis von Gewichtsteilen

I. EINLEITUNG

Der Primärstoffwechsel ist im wesentlichen für alle Lebewesen gleich und dient dem Aufbau, der Erhaltung und Vermehrung der Organismen. Er umfaßt enzymkatalysierte katabole, amphibole und anabole Stoffwechselleistungen, die Intermediärprodukte und Energie liefern und biosynthetische Vorstufen in essentielle Makromoleküle wie Desoxyribonukleinsäuren, Ribonukleinsäuren, Proteine, Lipide und Polysaccharide verwandeln. Die Stoffwechselreaktionen sind fein ausbalanciert und keine als für das Überleben der Zelle nötigen Zwischenprodukte häufen sich an (Drew and Demain, 1977).

Zusätzlich zu diesem allgemeinen Stoffwechsel sind bestimmte taxonomische Gruppen wie die Actinomycetales in der Lage, Substanzen zu synthetisieren, denen keine unmittelbare Funktion zugeschrieben werden kann (BuLock, 1965). Über die mögliche Funktion dieser als Sekundärmetabolite bezeichneten Verbindungen existieren mehrere Hypothesen (Zähner, 1978). Die Sekundärmetabolite besitzen oft ungewöhnliche chemische Strukturen und gehören den verschiedensten Klassen von organischen Verbindungen an (Berdy, 1974).

In der Vergangenheit wurde den Sekundärstoffwechselprodukten, die antibiotische Eigenschaften zeigten, größte Aufmerksamkeit geschenkt. Die Anwendung der Antibiotika beschränkte sich meist auf die Therapie von Infektionskrankheiten des Menschen (Waksman, 1969).

Allein die Vielfalt an chemischen Strukturen bei den Sekundärmetaboliten läßt jedoch biologische Wirkungen, die über die rein antibiotische Aktivität hinausgehen, vermuten (Woodruff, 1980); doch um mit Goethe (1819) zu sprechen: "Man erblickt nur, was man schon weiß und versteht".

Diesem Gedanken wurde erst in jüngerer Zeit durch Erweiterung der bisher verwendeten klassischen, target-orientierten Screeningmethoden Rechnung getragen (Zähner, 1977).

Im folgenden sollen einige Sekundärstoffwechselprodukte mit interessanten biologischen Eigenschaften angesprochen werden, die zeigen, daß Sekundärmetaboliten zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in der Tier- und Humanmedizin sowie im Pflanzenschutz haben und als sinnvolle Ergänzung zu den chemischen Synthetika betrachtet werden können (Demain, 1983).

Matthews and Wade (1977) beschrieben vielfältige pharmakologische Eigenschaften von Sekundärstoffwechselprodukten. Als Beispiele seien hier nur die Ergotalkaloide und das Cyclosporin A näher erwähnt.

Die schon seit Jahrzehnten genutzten Ergotalkaloide aus Claviceps-Arten sind heute aus der Therapie von Migräne, Durchblutungsstörungen, Hypotonie sowie aus der Geburtshilfe nicht mehr wegzudenken (Berde and Schild, 1978).

Vielversprechend ist das antifungisch wirkende Antibiotikum Cyclosporin A aus Trichoderma polysporum, das spezielle immunsuppressive Eigenschaften besitzt (Dreyfuss et al., 1976). Es findet bei Transplantationen von menschlichen Organen Verwendung.

Die Gruppe um Umezawa hat mit relativ einfachen enzymatischen Tests eine große Anzahl von Sekundärmetabolite mit enzyminhibitorischer Wirkung entdeckt und isoliert (Umezawa, 1977). Da einige Krankheiten des Menschen ihre Ursache in gestörten Enzymaktivitäten haben, sind Enzyminhibitoren nicht nur von wissenschaftlichem sondern auch von medizinischem Nutzen.

Acarbose, ein von Actinoplanes-Arten produzierter Sekundärmetabolit, ist ein Inhibitor von intestinalen α-Glucosidasen und bei kohlenhydratabhängigen Krankheiten wie Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie (Typ IV) und

Adipositas einsetzbar (Puls et al., 1977; Schmidt et al., 1977).

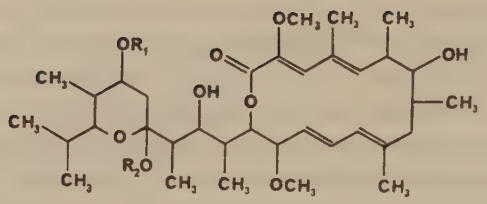
Im Insektizidbereich wird auf Grund der ökologischen Schäden, die durch den Einsatz von Breitspektruminsektiziden der Organophosphor-, Organochlor- oder Carbamatreihe hervorgerufen werden, und durch die zunehmend beobachtete Resistenzentwicklung bei Insekten, der Ruf laut nach neuen, für Mensch und Natur unschädlichen Pestiziden (Bodde, 1982).

Die Nikkomycine aus Streptomyces tendae erfüllen die an sie gestellten Forderungen. Sie sind gut abbaubar und haben auf Grund ihres spezifischen Wirkungsmechanismus, nämlich die Hemmung der nur bei Invertebraten und einigen Pilzen vorkommenden Chitinsynthase, eine geringe Toxizität gegenüber Säugetieren (Höhne, 1974).

Durch ein mit großem Aufwand betriebenes Antiparasitenscreening wurde aus Streptomyces avermitilis eine Gruppe von nah verwandten 16-gliedrigen Makroliden isoliert (Stapley and Woodruff, 1982). Diese als Avermectine bezeichneten Verbindungen zeigen antiparasitäre aber keine antibakterielle oder antifungische Wirkung und wären somit mit klassischen Screeningmethoden nicht aufzufinden gewesen. Das semisynthetische Derivat Ivermectin ist gegen Nematoden und Arthropoden tausendfach wirksamer als die seither zur Parasitenbekämpfung angewandten Benzimidazolderivate (Campell et al., 1983).

Bei den aus Streptomyces griseus - Arten isolierten Bafilomycinen handelt es sich um 16-gliedrige Makrolidantibiotika (Werner et al., 1983; Abb. 1), welche gegen einige grampositive Bakterien sowie gegen eine Vielzahl von Hefen und Pilzen wirksam sind (Werner et al., 1984).

Das ebenfalls aus Kulturbrühen des Bafilomycinproduzenten isolierte Tubaymycin unterscheidet sich strukturell von den Bafilomycinen durch den offenen Tetrahydropyranring (Abb. 2). Tubaymycin hat keine antibakterielle und nur eingeschränkte antifungische Aktivität (Kretschmer et al., 1984).



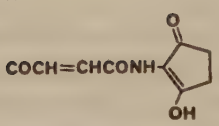
	R_1	R_2
A_1	H	H
A_2		CH_3
B_1		H
B_2		CH_3
C_1	$COCH=CHCOOH$	H
C_2		CH_3

Abb. 1: Struktur der Bafilomycine

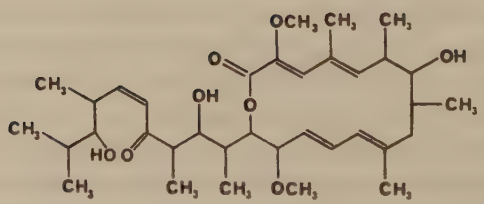


Abb. 2: Struktur des Tubaymycins

Da strukturelle Ähnlichkeiten der Bafilomycine sowohl zu den insektizid wirkenden Prasinonen (Box et al., 1973) als auch zu Concanamycin A, das die Proliferation von Lymphozyten hemmt (Kinashi et al., 1981), vorhanden sind, wurden von den Bafilomycinen weitere, über die antibakterielle und antifungische Aktivität hinausgehende, biologische Eigenschaften erwartet.

Aufgabe dieser Arbeit war es, größere Mengen an Bafilomycinen zur fungiziden, insektiziden und pharmakologischen Prüfung bereitzustellen. Desweiteren sollte versucht werden, mit biologischen Methoden modifizierte Bafilomycine sowie Aufschlüsse über die Wirkungsweise der Antibiotika zu erhalten.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Mit Ausnahme der hier aufgeführten Substanzen wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet.

1.1. Nährlösungsbestandteile

Ciba-Geigy, Basel, Schweiz	Fleischmehl
Deutsche Maizenawerke, Hamburg	Mannit
	Stärke
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto Agar
	Corn Meal Agar
	Nutrient Broth
	Oat Meal Agar
Heess GmbH & Co, Stuttgart	Sojaöl
Oxoid Deutschland, Wesel	Lab Lemco Powder
	Malt Extract
	Yeast Extract
Schoenenberger, Magstadt	Sojamehl

1.2. Chemikalien für Verfütterungsexperimente

Fluka AG, Buchs, Schweiz	Adipinsäure
	Äpfelsäure
	Aminopterin
	p-Aminosalicylsäure
	DL-Ethionin
	Fumarsäure

Fluka AG, Buchs, Schweiz	Glutarsäure
	Isocitronensäure
	Malonsäure
	p-Nitrobenzoesäure
	Oxalessigsäure
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	Isoleucin
	MES
	MOPS
	Tricin
Sigma Chemical Company, St.Louis, USA	Sulfadiazin
	Sulfaguanidin
	Sulfapyridin

1.3. Chemikalien für Fermentation und Aufarbeitung

Brenntag, Mühlheim/Ruhr	Niax-Polyol LHT 67
Deutsche Pharmacia, Frankfurt	Sephadex LH 20, Partikelgröße 25-100 µm
Hedinger, Stuttgart	Hyphlo Supercell (Celit)
Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg	Amberlite XAD-2, Partikelgröße 300-1000 µm
Waters Associates, Milford, USA	PicA

1.4. Chemikalien für biologische Tests

EGA-Chemie, Keppler & Reif, Steinheim, Albuch	NTG
Fluka AG, Buchs, Schweiz	ATP
	Valinomycin
Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg	CCCP

Sigma Chemical Company, St. Louis, USA	L-α-Phosphatidylcholin aus Sojabohnen
	Nigericin
	Nonactin
	Ouabain
	Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere

2. Nährmedien

Die Medien wurden nach Einstellen des pH-Wertes 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Gewichtsangaben beziehen sich jeweils auf 1 l Wasser. Bei chemisch definierten Medien wurde entionisiertes Wasser verwendet.

Medium 1:	Sojamehl	2.0 g
	Mannit	2.0 g
	pH 7.5	
Medium 2:	Fleischmehl	2.0 g
	Malzextrakt	2.0 g
	Kalk	1.0 g
	pH 7.2	
Medium 3:	Malzextrakt	10.0 g
	Hefeextrakt	4.0 g
	Glucose	4.0 g
	Agar	20.0 g
	pH 7.3	

Medium 4:	Glycerin	20.0 g
	Asparagin	2.0 g
	K_2HPO_4	0.5 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.5 g
	NaCl	0.5 g
	$CaCl_2$	0.2 g
	Spurenelementlösung	2 ml
	pH 7.5	

Medium 5:	Glycerin	20.0 g
	$NaNO_3$	2.0 g
	K_2HPO_4	0.5 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.5 g
	NaCl	0.5 g
	$CaCl_2$	0.2 g
	Spurenelementlösung	2 ml
	Agar	20.0 g
	pH 7.5	

Spurenelementlösung nach Okanishi et al. (1974)

$FeCl_3 \times 6\ H_2O$	0.20 g
$ZnCl_2$	0.04 g
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	0.01 g
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	0.01 g
$Na_2B_4O_7 \times 10\ H_2O$	0.01 g
$(NH_4)_6MO_{24} \times 4\ H_2O$	0.01 g

mit entionisiertem Wasser ad 1 l

Medium 6:	Ox Lab Lemco	10.0 g
	Pepton aus Casein	10.0 g
	NaCl	5.0 g
	Agar	15.0 g
	pH 7.2	

Medium 7:	Malzextrakt	20.0 g
	Agar	17.0 g
Medium 8:	Nutrient Broth	8.0 g
	Agar	20.0 g
Medium 9:	Corn Meal Agar	17.0 g
Medium 10:	Glucose	8.00 g
	NaCl	5.00 g
	Di-Ammoniumtartrat	4.00 g
	K_2HPO_4	2.00 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1.00 g
	$CaCl_2$	0.20 g
	$MnSO_4 \times H_2O$	0.01 g
	Ferrioxamin B	0.02 g
	Agar	15.00 g
Medium 11:	Glutaminsäure	1.500 g
	Glucose	1.000 g
	KH_2PO_4	0.500 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.200 g
	NaCl	0.100 g
	Biotin	0.003 g
	Agar	15.000 g
	pH 6.8	
Medium 12:	Pepton aus Casein	20.0 g
	Glucose	5.0 g
	Malzextrakt	3.0 g
	Hefeextrakt	3.0 g
	Ox Lab Lemco	3.0 g
	Ascorbinsäure	0.2 g
	Agar	17.0 g
	pH 7.0	

3. Mikroorganismen

3.1. Bafilomycinproduzenten

Streptomyces griseus subspecies griseus TÜ 2437
Streptomyces griseus subspecies griseus TÜ 2599

3.2. Teststämme

a) Bakterien	Kulturbedingungen Temp.(°C)	Medium
Achromobacter geminiani Ravenel, Institut für Mikrobiologie, Göttingen	27	3
Agrobacterium tumefaciens (Smith & Townsend) Conn ATCC 15955	27	3
Arthrobacter aurescens (Clark) Phillips ATCC 13344	27	8
Arthrobacter crystallopoietes Ensign & Rittenberg ATCC 15481	27	8
Arthrobacter globiformis (Conn) Conn & Dimmick ATCC 8010	27	8
Arthrobacter pascens Lochhead & Burton ATCC 13346	27	8
Bacillus brevis Migula ATCC 9999	37	3
Bacillus subtilis Conn ATCC 6051	37	3/10
Brevibacterium sterolicum Terada et al. ATCC 21387	37	6
Clostridium pasteurianum Winogradsky ATCC 6013	30	12
Corynebacterium insidiosum (McCulloch) Jensen ATCC 10253	27	6
Corynebacterium rathayi (Smith) Dowsen ATCC 13659	27	6

	Kulturbedingungen Temp. (°C)	Medium
Escherichia coli (Migula) Castellani & Chalmers K 12	37	3/10
Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn ATCC 381	27	8
Proteus mirabilis Hauser ATCC 29906	37	6
Proteus vulgaris Hauser ATCC 13315	37	6
Pseudomonas fluorescens Migula ATCC 13525	27	8
Staphylococcus aureus Rosenbach TÜ 202 (= ETH 2070)	37	6
Streptomyces antibioticus (Waksman & Woodruff) Waksman & Henrici TÜ 4	37	3
Streptomyces diastatochromogenes (Krainsky) Waksman & Henrici TÜ 20	27	3
Streptomyces glaucescens (Preobrazhenskaya) Pridham et al. TÜ 49	27	3
Streptomyces griseus (Krainsky) Waksman & Henrici TÜ 17	27	3
Streptomyces lavendulae (Waksman & Curtis) Waksman & Henrici TÜ 35	27	3
Streptomyces prasinus Ettlinger et al. TÜ 30	27	3
Streptomyces violaceoruber (Waksman & Curtis) Waksman TÜ 22	37	3

b) Hefen und Pilze

Alternaria mali Roberts (Polyoxin sensitiv)	27	9
Alternaria mali Roberts (Polyoxin resistent)	27	9
Aspergillus niger van Tieghem TÜ 503	37	3
Aspergillus terreus Thon TÜ 155	27	3
Botrytis cinerea Persoon ex Fries TÜ 157	24	7
Candida albicans (Robin) Berkhout TÜ 164	37	3

	Kulturbedingungen	
	Temp. (°C)	Medium
Candida guilliermondii (Castellani) Langeron & Guerra	27	3
Candida membranaefaciens (Lodder & Kreger-van Rij) Wickerham & Burton DSM 40109	27	3
Coprinus cinereus (Schaeffer ex Fries) Gray Tü 637	24	3
Fuasarium spec. Tü 8014	27	3
Hansenula anomala (Hansen) Sydow Tü 279	27	3
Lipomyces lipofer (den Dooren den Jong) Lodder & Kreger-van Rij	27	3
Mucor hiemalis (+) Wehmer Tü 179	24	3
Mucor hiemalis (-) Wehmer Tü 180	24	3
Mucor miehei Cooney & Emerson Tü 284 (= ETH M 52)	37	3/11
Nadsonia fulvescens (Nadson & Konokotina) Sydow Tü 561	27	3
Neurospora crassa Shear & Dodge	27	3
Paecilomyces varioti Bainier Tü 137 (= ETH M 4646)	37	3
Penicillium puberulum Bainier Tü 8006	27	3
Pythium debaryanum Hesse CBS 114.19	24	9
Rhizoctonia solani Kühn CBS 325.47	24	7
Rhodotorula rubra (Demme) Lodder	27	3
Saccharomyces cerevisiae Hansen Tü 125	27	3
Saccharomyces cerevisiae FL 200 Gause, Moskau	27	3
Saccharomyces cerevisiae FL 599-1B, Gause, Moskau	27	3
Saccharomycopsis lipolytica (Wickerham et al.) Yarrow CBS 599	27	3
Saprolegnia asterophora de Bary CBS 180.44	24	7
Schizosaccharomyces pombe Lindner TÜ 501	27	3
Wingea robertsii (van der Walt) van der Walt ATCC 22312	27	3

4. Gewinnung und Charakterisierung von Mutanten

4.1. Herstellung einer Sporensuspension

Ein Schrägagarkolben (Medium 3) wurde mit dem auf Schrägröhrchen gezogenen Streptomyceten angeimpft und 14 Tage bei 27°C inkubiert. Die Sporen wurden mit 30 ml Saline (mit 1 Tropfen Tween) abgeschwemmt und die Sporenkette durch Schütteln mit Glasperlen zerschlagen. Die Suspension wurde durch Glaswolle filtriert und zwei Mal mit Saline gewaschen. Der Titer der Sporensuspension wurde über Lebendkeimzahlbestimmung ermittelt.

4.2. Gewinnung von Mutanten durch NTG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin)-Mutagenese

Zu 1 ml Sporensuspension von Tü 2437 wurden 9 ml Tris-Maleat-Puffer 0.05 M, pH 9.0 gegeben, so daß der Titer 4.2×10^8 Sporen pro ml betrug. Nach Zugabe von 2ml NTG/ml wurde die Suspension bei 37°C inkubiert. Alle 10 Minuten und nach einer Stunde alle 30 Minuten wurde je 0.5 ml Probe entnommen. Die Proben wurden sofort 4 Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge, Modell 3200, abzentrifiguiert und zwei Mal mit Saline gewaschen. Um den Titer der überlebenden keimfähigen Sporenfraktion zu bestimmen, wurde von jeder Probe eine Verdünnungsreihe angesetzt und ausplattiert (Medium 3).

Die Sporensuspension des Zeitwertes mit 0.1 % Überlebensrate wurde mit Saline derart verdünnt, daß pro Platte 50-100 Kolonien wuchsen. Nach 4 Tagen Inkubation bei 27°C wurden diese Platten auf Minimalmedium (Nr. 5)- und Vollmedium (Nr. 3)-Platten mit Hilfe eines Samtstempels nach Lederberg und Lederberg (1952) repliziert. Die Replikaplatten wurden

nach zweitägiger Inkubation miteinander verglichen. Die vermuteten auxotrophen Kolonien sowie Kolonien, die sich durch Farbstoffbildung oder stark verändertes bzw. fehlendes Luftmycel auszeichneten, wurden in Rasterform auf Vollmediumplatten übertragen. Nach einer zweiten Prüfung wurden die Mutanten auf ihr Wuchsstoffbedürfnis und auf ihre Bafilomycinproduktion untersucht.

4.3. Charakterisierung von Mutanten

Das Wuchsstoffbedürfnis der einzelnen Mutanten wurde nach der Methode von Holliday (1956) bestimmt. Die zu charakterisierenden auxotrophen Mutanten wurden auf einer Vollmediumplatte ausgestrichen und bis zur Sporulation inkubiert. Diese Vorlageplatte wurde auf jeweils 12 Minimalmediumplatten, die unterschiedliche Gruppen von Supplementen enthielten, und als Kontrolle auf eine Vollmediumplatte repliziert. Auf Grund der unterschiedlichen Wachstumsmuster konnten die auxotrophen Mutanten zum Teil charakterisiert werden. Die Konzentration der Supplemente in den Minimalmedien (Grundmedium 5) betrug für Aminosäuren 0.1 mg/ml, für Purine und Pyrimidine 0.02 mg/ml und für Vitamine 0.002 mg/ml.

5. Methoden zur Herstellung der Antibiotika

5.1. Schüttelkolbenversuche

100 ml Nährlösung 1 in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich wurde 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Der Kolben wurde mit einer auf Schrägröhrchen (Medium 3) ge-

zogenen Kultur von Tü 2437 bzw. Tü 2599 angeimpft und 27 Stunden bei 27°C auf einer rotierenden Schüttelmaschine mit 120 rpm inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden je 100 ml sterile Nährlösung angeimpft und unter denselben Bedingungen je nach Versuchsanforderung bis zu 23 Tage inkubiert.

5.2. Fermentation

Die Fermentationen wurden im 10 l-, 20 l-, 25 l-, 100 l- und 200 l-Maßstab durchgeführt.

a) 10 l- und 100 l-Fermentation
Fermenter mit 10 l Nutzinhalt (Modell MF-14, New Brunswick, Scientific Co., New Brunswick, USA) wurden mit 9 l Nährlösung 1 gefüllt und 30 Minuten bei 134°C sterilisiert. Der abgekühlte Fermenter wurde mit 1 l einer 27 Stunden alten Vorkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27°C, 240 rpm des Blattrührers, mit 4 l, 6 l oder 8 l steriler Luft pro Minute und unter Zusatz von mindestens 1.5 ml äthanolischer Polyollösung. Die Fermentationen dauerten ca. 96 Stunden.

Als Impfmaterial für den ebenfalls mit Blattrührwerk arbeitenden 100 l Fermenter (Modell F-130 Fermacell, New Brunswick, USA) diente ein 24 Stunden alter 10 l Fermenter. Der 100 l Fermenter wurde bei 27°C und 200 rpm 72 Stunden betrieben. Die Luftzufuhr betrug 2550 l/Stunde. Die Schaumbildung wurde durch wiederholte Gabe von Polyollösung unterdrückt.

b) 25 l-Fermentation
Der 25 l Fermenter (Typ b 25, Giovanola Frères SA., Monthey, Schweiz) wurde mit 22.5 l Nährlösung 1 und 3 ml äthanolischer Polyollösung beschickt und in situ bei 121°C für

30 Minuten sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde mit 2.5 l einer 27 Stunden alten Vorkultur angeimpft und bei 28°C, 800 rpm, 1000 rpm oder 1200 rpm und 750 l Luft/Stunde 4 bis 6 Tage fermentiert.

c) 20 l- und 200 l-Fermentation
Beide Fermentertypen verfügen wie auch der 25 l Fermenter über ein Umwurfsystem zur Durchmischung der Kulturbrühe. Der 20 l Fermenter (Modell b 20, Giovanola Frères SA., Monthey, Schweiz) wurde mit 18 l Nährlösung 1 und 2 ml Polyollösung versehen in situ 20 Minuten bei 121°C sterilisiert und mit 2 l einer 27 Stunden alten Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 28°C, 800 rpm und 600 l Luft/Stunde inkubiert. Der Fermenter wurde nach 5-7 Tagen geerntet oder bereits nach 24 Stunden als Impfmaterial für den 200 l Fermenter (Typ b 200, Giovanola Frères SA., Monthey, Schweiz) verwendet. Die 200 l-Fermentation verlief unter folgenden Bedingungen: 180 l in situ sterilisierte Nährlösung 1, 8 ml Polyollösung, 28°C, 6000 l Luft pro Stunde, 800 rpm. Die Ernte erfolgte nach 3 bis 5 Tagen.

5.3. Fermentationsanalyse

a) pH-Messung
Während den Fermentationen, ausgenommen die 10 l-Fermentationen, wurde der pH-Wert in situ mit einer sterilisierbaren Elektrode (Typ 465 VT, Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz) gemessen. Der pH-Wert der übrigen Proben wurde mit einem Labor-pH-Meter (PHM 62 Standard pH-Meter, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) bestimmt.

b) Myceltrockengewicht
Die Bestimmung des Myceltrockengewichts erfolgte nach Kurth (1981).

c) Bestimmung des Antibiotikumgehaltes
Die Proben wurden wie unter II.7.2. beschrieben aufgearbeitet und der Antibiotikagehalt mit Hilfe der HPLC bestimmt.

5.4. Isolierung und Reinigung der Antibiotika

Die Kultur wurde mit 10 % Aceton versetzt, ca. 30 Minuten gerührt und nach Zugabe von 2 % Celit mit einer Filterpresse (Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd) in Kulturfiltrat und Mycel getrennt. Das Kulturfiltrat wurde mit weiteren 10 % Aceton versetzt und über eine mit Amberlite XAD-2 gefüllte Säule gegeben. Pro Liter Kulturfiltrat wurden ca. 100 g XAD-2 verwendet. Die Säule wurde mit Wasser und Aceton/Wasser 1/4 (v/v) gewaschen. Die Desorption erfolgte mit Aceton. Das XAD-2-Eluat wurde eingeengt, mit Wasser versetzt und 3-4 Mal mit demselben Volumen an Ethylacetat extrahiert.

Das Mycel wurde durch dreimalige Extraktion mit Ethanol/Aceton 1/1 (v/v) aufgeschlossen und der Extrakt bis zum wässrigen Rückstand eingeengt. Dieser Rückstand wurde mit Wasser verdünnt und 3-4 Mal mit demselben Volumen an Ethylacetat extrahiert. Die einrotierten Ethylacetatextrakte wurden durch mehrmalige Mitteldruckchromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform bis zu den Einzelkomponenten aufgereinigt. Noch vorhandene Mischfraktionen konnten anschließend über Kieselgel RP 18 aufgetrennt werden.

6. Optimierung der Bafilomycinproduktion und Verfütterungsexperimente

6.1. Nährmedien

Die Streptomyceten Tü 2437 und Tü 2599 wurden in verschiedenen Nährlösungen bei 27°C inkubiert. Am 3. bis 8. Versuchstag wurde Probe genommen, nach II.7.2. aufgearbeitet und mit HPLC analysiert. Bei Medium 1 wurden zudem die Bestandteile in ihren Gewichtsverhältnissen variiert, d.h. Sojamehl 1-4 % und Mannit 1-4 %. Die komplexen Medien wurden mit einer Vorkultur angeimpft, das synthetische Medium 4 mit Sporensuspensionen.

6.2. C-Quellen-Test

Von Nährlösung 1 und 4 ausgehend wurden als Kohlenstoffquelle Mannit, Glucose, Lactose, Glycerin, Saccharose und stärke verwendet. Die Antibiotikaproduktion wurde über einen Zeitraum von 13 Tagen überprüft.

6.3. Belüftung

Für die Belüftungsversuche dienten 500 ml Erlenmeyerkolben:
a) ohne seitlichen Einstich
b) mit einem seitlichen Einstich
c) mit vier seitlichen Einstichen
Die Kolben wurden mit 50 ml oder 100 ml, die Kolben ohne seitlichen Einstich zudem mit 200 ml Nährlösung 1 gefüllt und auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Kühner, Basel, Schweiz) bzw. oszillierenden Schüttelmaschine (Infors AG, Basel, Schweiz) für 7 Tage inkubiert. Proben von 3., 5. und 7. Tag wurden auf ihren Antibiotikagehalt untersucht.

6.4. Temperaturgradient

Die optimale Produktionstemperatur wurde mit dem Temperature Gradient Inkubator, Modell TN-3, Toyo Kagak Sangyo Co., Tokyo, Japan, bestimmt. Die Temperatureinstellung war von 15°C bis 45°C gewählt. 30 rechtwinklig gebogene Reagensgläser mit ca. 1°C Temperaturunterschied wurden mit je 9 ml Nährlösung 1 gefüllt, mit 1 ml einer 27 Stunden alten Vorkultur angeimpft und gleichmäßig geschüttelt. Am 3., 5. und 7. Versuchstag wurde mit abgeschnittenen Eppendorfpipettenspitzen aus jedem Glas steril 0.5 ml Probe entnommen und zur HPLC-Untersuchung vorbereitet.

6.5. pH-Wert

Tü 2437 und Tü 2599 wurden in Medium 1 zusammen mit den zwitterionischen Puffern MES, MOPS und Tricin angezogen. Die Puffersubstanzen wurden zu je 50 mM, 100 mM und 150 mM zugesetzt. Der Ausgangs-pH-Wert betrug bei MES 6.15, bei MOPS 7.15 und bei Tricin 8.15. Die Antibiotikaproduktion und der pH-Verlauf wurden über 7 Tage beobachtet.

6.6. Verfütterungen

Die Verfütterungen der im Ergebnisteil angegebenen Supplemente sollte einerseits zu einer Steigerung der Bafilomycinproduktion und andererseits zur Bildung von modifizierten Bafilomycinen führen. Die Supplemente wurden meist getrennt von den Nährlösungen sterilisiert und zu bestimmten Zeiten der wachsenden Kultur steril zugegeben. Wenn nicht anders vermerkt, wurden am 3., 5. und 7. Tag Proben entnommen und der Antibiotikagehalt mittels HPLC bestimmt. Die genauen Bedingungen sind im Ergebnisteil angegeben.

7. Methoden zur chemischen und physikalischen Charakterisierung

7.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie diente zur Überprüfung der Reinheit und zur Identifizierung der Bafilomycine. Die Durchführung erfolgte nach Stahl (1967). Es wurden gebrauchsfertige Dünnschichtplatten der Firma Merck, Darmstadt (Kieselgel 60, F_{254}, Schichtdicke 0.25 mm) verwendet. Die Laufmittel, Rf-Werte und Detektionsmöglichkeiten sind im Ergebnisteil (III.5.1. bzw. III.8.3.) angegeben.

7.2. HPLC

a) Probenaufarbeitung
0.5 ml Kultur wurden mit 0.5 ml Aceton p.a. versetzt, 30 Sekunden geschüttelt (Stufe 3, Vortex-Genie, Modell K 550-GE, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) und in einer Eppendorftischzentrifuge, Modell 3200, 2 Minuten zentrifugiert. 5 µl des klaren Überstandes wurden auf die Säule aufgespritzt.

b) Apparatur[1)]
Pumpe: Waters Associates chromatography pump, Modell 6000 A
Injektor: Waters Associates injector, Modell U6K
Detektor: Biotronik UV-Detektor BT 3030, Messung bei 254 nm
Integrator: Hewlett Packard 3390 A

---

1) Die HPLC-Untersuchungen konnten im Arbeitskreis von Herrn Prof. H. Hagenmaier, Organisch-Chemisches Institut, Universität Tübingen, durchgeführt werden.

Säule: Shandon ODS Hypersil RP 18, Partikelgröße 5 µm,
Länge 12.5 cm, Innendurchmesser 4.6 mm
Fließmittel: 240 ml Acetonitril, 225 ml Methanol,
145 ml Wasser, 1/2 Fläschchen PicA
Fließgeschwindigkeit: variierend, 2-4 ml/min

c) Quantitative Auswertung
Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Extinktion einer Lösung der Konzentration des gelösten Stoffes proportional. Mit Standardlösungen wurde für jedes Bafilomycin eine Eichgerade ermittelt. Die Peakflächen der zu bestimmenden Proben wurden dazu in Beziehung gesetzt und ergaben so nach Umrechnung den Antibiotikagehalt der Probe.

8. Methoden zur biologischen Charakterisierung

8.1. Plattendiffusionstest

Der Plattendiffusionstest wurde nach Zähner und Maas (1972) durchgeführt und diente zur Aufnahme des Wirkungsspektrums. Um Testplatten von Pilzen und Bakterien herzustellen, wurde ein Schrägagarröhrchen einer gut gewachsenen Kultur mit 3 ml Saline abgeschwemmt. Die Suspension wurde in 200 ml des entsprechenden Agars (II.3.2.) gegeben und in 10 ml Portionen in sterile Polystyrol-Petrischalen (Greiner, Nürtingen) gegossen. Hefeartig wachsende Pilze wurden in Schüttelkultur 18 bis 24 Stunden angezogen. Diese Vorkultur wurde dazu benutzt, den entsprechenden Agar mit 10^6 Zellen pro ml zu versehen. Es wurden ebenfalls Testplatten mit je 10 ml gegossen.

Die Anfertigung von Platten mit Clostridium pasteurianum ist bei Santo (1976) und von Mucor hiemalis Tü 179/180 bei Kirst (1971) beschrieben.

Zum Testen von langsam wachsenden oder nicht sporulierenden Pilzen eignet sich der bei Hütter et al. (1965) beschriebene Test an der Riesenkolonie. Durch Mikroskopieren können morphologische Veränderungen erkannt werden.

8.2. Bioautographie

Die Durchführung erfolgte wie bei Kirst (1971) beschrieben.

9. Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise

9.1. Streifengradiententest

Die Testanordnung ist bei Drautz (1975) beschrieben. Die Platten enthielten einen Kaliumgradienten von 0 bis 1.0 Mol K^+ pro Liter Medium. Als Testkeim wurde Mucor miehei Tü 284 in Medium 11 verwendet, wobei K_2HPO_4 durch Na_2HPO_4 ersetzt worden war.

9.2. Messung an Lipidvesikeln

a) Präparation der Liposomen
500 mg L-α-Phosphatidylcholin aus Sojabohnen wurden mit 11 ml Kaliumphosphatpuffer (0.5 M, pH 7) versetzt und unter Eiskühlung in 20 Sekunden Intervallen 10 Minuten lang mit Ultraschall beschallt (Leistungsstufe 3, Sonifier, Modell S-125, Branson Instr. Inc., Conneticut, USA). Nach Zugabe von 30 ml eisgekühltem Wasser wurden die Liposomen abzentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge, Modell L5-50, Beckmann Instr. GmbH, München). Die Bedingungen waren:

70 Ti-Rotor, 50000 rpm, 1 Stunde, 4°C. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abpipettiert und das Sediment vorsichtig mit wenig 0.4 M Saccharoselösung (mit 2.5 mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$) gewaschen. Unter Eiskühlung wurde das Sediment in 8 ml Saccharoselösung (0.4 M) suspendiert.

b) Messung mit der pH-Elektrode

Die Messung der aus den Liposomen ausgetretenen Kaliumionen kann indirekt über die Messung der pH-Änderung im Außenmedium, die durch den Einstrom von Wasserstoffionen in die Liposomen verursacht wird, bestimmt werden. Der pH-Sprung wurde mit einem Schreiber aufgezeichnet. Die Messung fand bei 25°C in einer Meßzelle statt.

Meßansatz: 1.4 ml Saccharoselösung (0.4 M)
0.2 ml Liposomensuspension
5 µl CCCP bzw. DMSO bzw. Antibiotikalösung

9.3. Test an der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere

Ein Unit der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere katalysiert die Umsetzung von 1 µMol ATP in 1 µMol ADP und 1 µMol Phosphat bei einem pH von 7.4 und in Anwesenheit von Na^+-, K^+- und Mg^{2+}-Ionen. Das entstandene Phosphat wurde mit einer Modifikation der Bestimmungsmethode nach Chen et al. (1956) kolorimetrisch nachgewiesen. In Vorversuchen wurde der optimale Meßbereich ermittelt. Er lag bei 0 bis 5 µMol Phosphat pro Küvette.

Reaktionsansatz: 100 µl NaCl (1 M)
25 µl KCl (1 M)
25 µl $MgCl_2$ (1 M)
20 µl ATP (30 mM)
10 µl ATPase (1 Unit/ml)
10 µl DMSO bzw. Antibiotikalösung bzw. Ouabainlösung
Tris HCl (50 mM, pH 7.4) ad 1.0 ml

Der Reaktionsansatz ohne ATP wurde für 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert (Eppendorf Thermostat, Modell 5320). Durch Zugabe von ATP wurde die Reaktion gestartet. Nach 60 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Eiskühlung abgebrochen. 300 µl dieser Lösung wurden mit 700 µl einer Reagenslösung gemischt, die 6 Volumenanteile 0.42 % NH_4-heptamolybdat in 1 N H_2SO_4 und 1 Volumenanteil 10 %ige Ascorbinsäurelösung enthielt. Zur Farbstoffentwicklung wurde dieser Ansatz zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die sofortige Bestimmung der Extinktion bei 625 nm erfolgte mit einem Eppendorf Photometer, Modell 1101 M.

Da dieser Phosphatnachweis äußerst empfindlich ist, ist darauf zu achten, daß nur analysenreine Chemikalien und doppelt destilliertes Wasser verwendet werden. Es können nur Einmalgefäße oder neue Glaswaren benutzt werden, da geringste Spülmittelspuren bereits den Phosphatnachweis erbringen.

9.4. Test an der K^+-ATPase aus E. coli

Es wurde die Wirkung der Bafilomycine auf eine K^+-ATPase untersucht, die aus einer unter K^+-limitierenden Bedingungen wachsenden E. coli-Kultur isoliert worden war. Der Nachweis für die Enzymaktivität erfolgte über das freigesetzte Phosphat, das als Molybdänblau photometrisch bestimmbar ist. Der Test ist ähnlich automatisiert wie bei Arnold et al. (1976) beschrieben[1].

Reaktionsansatz: 9.65 ml Tris HCl (50 mM, pH 7.6)
0.15 ml $MgCl_2$ (1.5 mM)

---

[1] Für die Präparation des Enzyms und die ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung dieser ATPase-Tests danke ich Herrn Prof. K. Altendorf und Frau Dipl.-Biol. A. Siebers, Fachbereich Biologie, Universität Osnabrück.

0.1 ml KCl (1 mM)
75 µl ATPase (0.18 mg Protein nach Dulley, 1975)
75 µl ATP (1 mM)
10 µl DMSO bzw. Antibiotikalösung

Nach einer Vorinkubation von 10 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet. Nach einminütiger Inkubation wurde das Reaktionsgemisch angesaugt und mit Hilfe einer Mehrkanalspumpe weiterbefördert. Nacheinander wurden Trichloressigsäurelösung (25 mM TCA, 28 mM SDS), Luft und Reagenslösung dazugepumpt, wobei das jeweilige Volumen vom Durchmesser der zuführenden Schläuche abhängig war.

Zusammensetzung der Reagenslösung:

7 mM Ammoniumheptamolybdat
0.9 M H_2SO_4
0.3 mM Kalium-Antimonyltartrat
0.114 mM Ascorbinsäure

Trichloressigsäurelösung stoppt die Enzymreaktion und das darin enthaltene SDS solubilisiert die Proteine. Die zugepumpte Luft dient dazu, das Reaktionsgemisch in kleine, durch Luftblasen getrennte Einheiten zu zerlegen und macht dadurch das Vermischen der Flüssigkeit in der Mischspule effektiver.

Nach der Farbentwicklung im Wasserbad bei 40°C wurde die Extinktion bei 578 nm in einem Photometer mit Durchflußküvette gemessen und mit einem Schreiber aufgezeichnet (Abb. 3).

Mit derselben Versuchsanordnung konnte auch die Wirkung der Bafilomycine auf eine ebenfalls aus E. coli isolierte Protonen-ATPase überprüft werden. Die Endkonzentration an Bafilomycin im Reaktionsansatz betrug bei diesen Versuchen 0.01 bis 100 µMol.

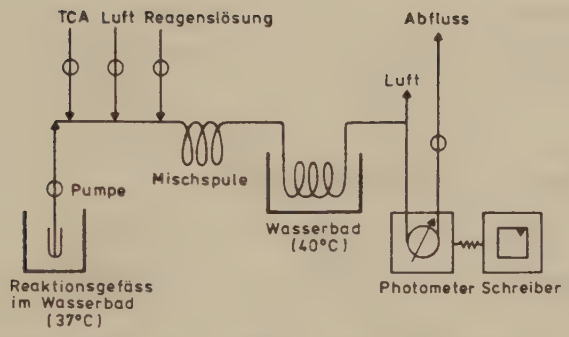


Abb. 3: Anordnung des automatisierten Tests zur Messung von ATPase-Aktivitäten

III. ERGEBNISSE

1. Beschreibung der Produzentenstämme

1.1. Nomenklatur

Der Streptomycetenstamm Tü 2437 stammt aus einer am River Kwai, Thailand, gesammelten Bodenprobe. Er wurde nach der Nomenklatur und Systematik von Hütter (1967) bestimmt und konnte der Art Streptomyces griseus zugeordnet werden.

Aus einer Bodenprobe von der Halbinsel Sillustani, Peru, wurde der Streptomycetenstamm Tü 2599 isoliert und ebenfalls als Streptomyces griseus charakterisiert.

1.2. Wachstumsverhalten

Die beiden Streptomyceten Tü 2437 und Tü 2599 wachsen in Flüssigmedium 1, angeimpft mit 1 % (v/v) einer 27 Stunden alten Vorkultur, rasch an und erreichen wie aus Abb. 4 zu ersehen ist bereits nach ca. 30 Stunden das Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Die folgende starke Abnahme des Myceltrockengewichts geht einher mit einer deutlichen Verringerung der Viskosität der Kulturbrühe. Mikroskopisch betrachtet lassen sich Zellfragmente erkennen, die auf eine bereits einsetzende Lyse der Zellen hindeuten. Der pH-Wert der Kultur steigt innerhalb der ersten 48 Stunden auf etwa 8.2 an und sinkt dann langsam wieder ab. Die erste Bafilomycinbildung ist schon nach 10 Stunden in Spuren nachweisbar.

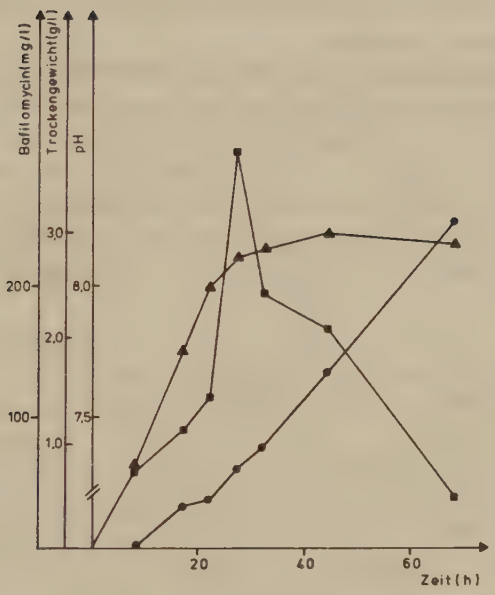


Abb. 4: Wachstumsverhalten einer Schüttelkultur von Tü 2599

- ● Bafilomycine (A_1, B_1 und C_1)
- ▲ pH
- ■ Myceltrockengewicht

2. Mutanten von Tü 2437

2.1. NTG-Mutagenese

Die Mutagenese wurde wie unter II.4.2. beschrieben durchgeführt. Nach Delic et al. (1970) wurden pH 9 gewählt. Bei einer Überlebensrate von 0.1 % ist nach Hopwood (1970) mit

einer hohen Anzahl von Mutanten zu rechnen, die meist nur eine Auxotrophie aufweisen.

Aus der Absterbekurve ergibt sich eine Überlebensrate von etwa 0.1 % nach 50 minütiger Mutagenese.

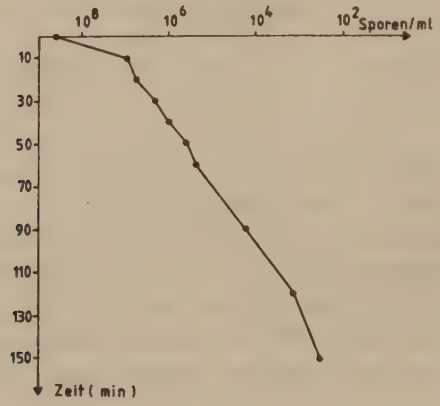


Abb. 5: Absterbekurve von Sporen des Stammes Tü 2437 unter Einwirkung von NTG

2.2. Auxotrophe Mutanten

Die Ausbeute an charakterisierbaren auxotrophen Mutanten betrug nur 0.2 %. Unter den 34 auxotrophen Mutanten konnten vermehrt die Marken ura^- (4 Mal), ade^- (3 Mal) und thr^- (3 Mal) festgestellt werden. Bei Tü 2437/24 handelt es sch um eine met^-- und bei Tü 2437/38 um eine val^--Mutante.

2.3. Mutanten mit verändertem Bafilomycinmuster

Die HPLC-Untersuchungen der 34 auxotrophen Mutanten wie auch der Mutanten, die durch verändertes oder fehlendes Luftmycel oder durch Bildung eines Farbstoffes aufgefallen waren, ergab nachfolgendes Bild. Die Mutanten waren 7 Tage in Medium 1 inkubiert worden. Für die Berechnung des Antibiotikagehalts wurde die vom Wildtyp Tü 2437 produzierte Bafilomycinmenge als 100 % festgesetzt.

- Bafilomycin A_1:
  9 Stämme zeigten eine 150 %ige Erhöhrung, 4 davon wiesen sogar eine über 200 %ige Steigerung auf.
- Bafilomycin B_1:
  5 Stämme zeigten eine 150 %ige Erhöhung. Bei 6 Mutanten war keine Bildung von Bafilomycin B_1 nachweisbar.
- Bafilomycin C_1:
  10 Stämme zeigten eine 150 %ige Erhöhung, 3 davon wiesen eine über 200 %ige Steigerung auf.
- Keine oder nur in Spuren nachweisbare Bafilomycinproduktion wurde bei 11 Mutanten gefunden.
- Ein bisher nicht näher untersuchter Peak mit Retentionszeit 2.72 min (Fließgeschwindigkeit 2 ml/min) erschien im HPLC-Chromatogramm von 18 Mutanten. Bei 5 Stämmen wurde eine erhöhte Produktion dieser Verbindung im Vergleich zum Wildtyp Tü 2437 festgestellt. Diese Verbindung wird im weiteren Text als Bafilomycin L bezeichnet.

In Tabelle 1 sind Mutanten von Tü 2437 aufgeführt, die für eine weitere Bearbeitung interessant scheinen.

Tabelle 1: Bafilomycinmuster der Mutanten von Tü 2437

Stamm	A_1>200%	B_1>150%	C_1>200%	L>150%	kein B_1
Tü 2437/ 6	x				
9		x		x	
20				x	
25					x
36			x		
40	x		x		
42	x	x			
49		x			
52	x				x
56		x		x	
57	x		x		x

3. Optimierung der Bafilomycinproduktion

3.1. Nährmedien

Die Summe der gebildeten Bafilomycine war bei Anzucht in Nährlösung 1 sowohl bei Tü 2437 als auch bei Tü 2599 am höchsten. Bei Verwendung von Nährlösung 2 konnten ebenfalls noch gute Ausbeuten erzielt werden; der Bafilomycin B_1-Gehalt war dabei verdoppelt. Alle weiteren getesteten Nährmedien brachten deutlich schlechtere Resultate.

Die Variation der Gewichtsverhältnisse bei Nährmedium 1 ergab ein Optimum der Produktion bei 2 % Sojamehl und 2 % Mannit.

In dem über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachteten synthetischen Medium 4 konnten nur geringste Spuren von

Bafilomycin A_1 und B_1 detektiert werden. In allen untersuchten Medien erwies sich Tü 2599 als der bessere Antibiotikaproduzent.

3.2. C-Quellentest

In Abb. 6a bis 6f ist der Verlauf der Bafilomycinbildung bei Tü 2599 dargestellt, wie er bei 13-tägiger Kultivierung in Medium 1 mit varrierten Kohlenstoffquellen zu erkennen war.

Die größte Bafilomycingesamtmenge wurde mit Mannit erzielt, wobei die hohe Konzentration an Bafilomycin C_1 mit über 400 mg/l auffällig ist. Glycerin und Glucose erbrachten ebenfalls gute Ausbeuten, bei den Disacchariden Lactose und Saccharose lag die Gesamtmenge an Antibiotika hingegen unter 300 mg/l. Wurde Stärke als C-Quelle angeboten, so kam es zu einer gesteigerten Produktion von Bafilomycin B_1, A_1 war in geringer Konzentration vorhanden, C_1 fehlte ganz. Im HPLC-Chromatogramm ist ein neuer Peak mit ähnlicher Retentionszeit wie Bafilomycin C_1 zu erkennen (III.8.).

Die Variation der C-Quelle im synthetischen Medium 4 erbrachte keine Verbesserung der ohnehin minimalen Antibiotikaproduktion.

Wie bereits unter II.3.1. beschrieben blieben die von Tü 2437 produzierten Antibiotikamangen weit hinter den von Tü 2599 gebildeten zurück. Mit Mannit bzw. Lactose als C-Quelle bildet Tü 2437 ca. 200 mg Bafilomycin pro Liter, das ist ein Viertel der Antibiotikaproduktion von Tü 2599. Hauptkomponente von Tü 2437 ist Bafilomycin B_1 mit 50 % des Antibiotikagehaltes. Bei den folgenden Versuchen zur Herstellung und Optimierung der Bafilomycinproduktion wurde deshalb mit Tü 2599 weitergearbeitet.

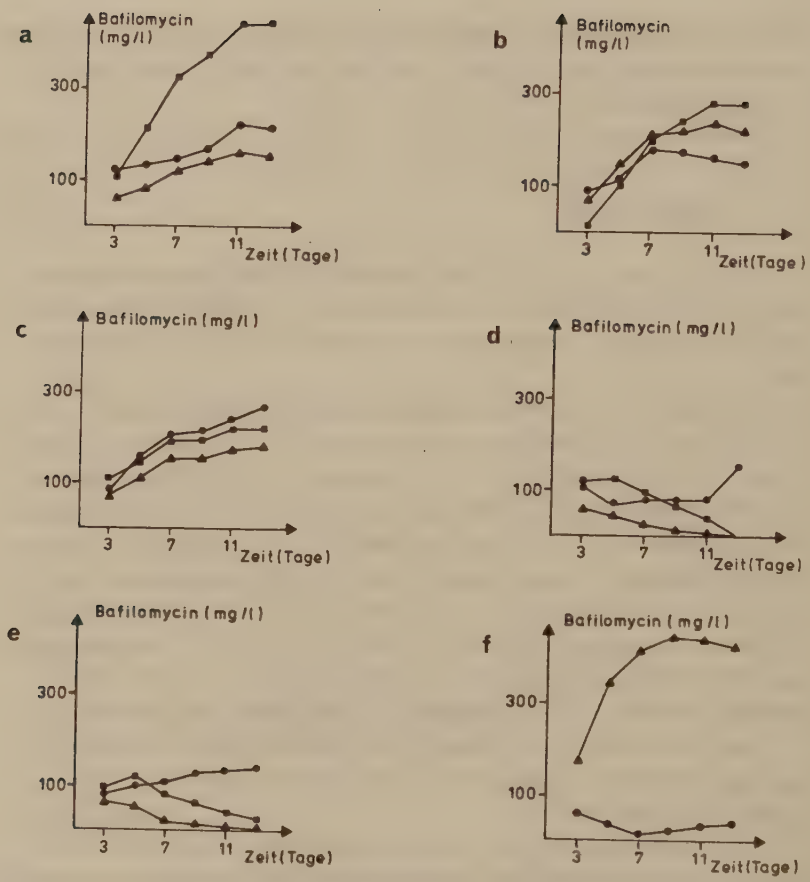


Abb. 6a-f: Bafilomycinproduktion bei Verwendung von verschiedenen C-Quellen

Abb. 6a: Mannit
Abb. 6b: Glycerin
Abb. 6c: Glucose
Abb. 6d: Lactose
Abb. 6e: Saccharose
Abb. 6f: Stärke

● Bafilomycin A_1
▲ Bafilomycin B_1
■ Bafilomycin C_1

3.3. Belüftung

In Erlenmeyerkolben ohne seitlichen Einstich mit 200 ml Füllvolumen war die Antibiotikaproduktion deutlich verringert. Höhere Bafilomycinproduktion erhielt man bei Kolben mit einem seitlichen Einstich und 50 ml Füllvolumen sowie bei Kolben mit vier Schikanen und 50 ml Nährlösung. Da die gebildete Antibiotikamenge in Kolben mit einem seitlichen Einstich und 100 ml Füllvolumen nur unwesentlich darunter lag, wurden aus technischen Gründen bei allen folgenden Verfütterungsversuchen diese Bedingungen gewählt.

3.4. Temperaturgradient

Abb. 7 zeigt die am 7. Versuchstag bei verschiedenen Temperaturen gebildeten Bafilomycine. Bafilomycin A_1, B_1 und C_1 unterscheiden sich stark in ihrem Temperaturoptimum. Das Maximum der Bafilomycin A_1-Produktion liegt bei 23°-25°C, das von B_1 bei 26.5°-29.5°C und das von C_1 bei 28°-30°C. Bei weiteren Fermentationen wurde als Kompromiß 28°C als Inkubationstemperatur gewählt.

3.5. pH-Wert

Der Nachweis von Bafilomycinen konnte nur im pH-Bereich von 6.5 bis 8.5 erbracht werden. Die Konzentration an Antibiotika war in mit MES oder MOPS gepufferten Medien erniedrigt, mit Tricin entsprach sie der Konzentration im Kontrollkolben.

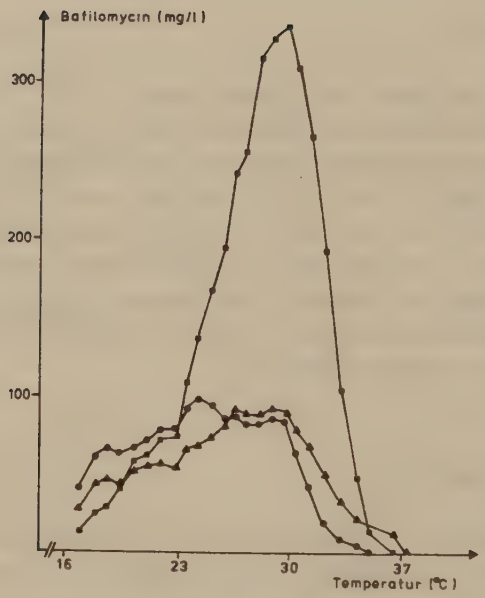


Abb. 7: Temperaturgradient von Tü 2599

● Bafilomycin A_1
▲ Bafilomycin B_1
■ Bafilomycin C_1

3.6. Zugabe von Sojaöl

Öle und längerkettige Fettsäuren können die Produktion von Makrolidantibiotika stimulieren (Martin and McDaniel, 1977).

Dies wurde auch bei Tü 2599 bei Zugabe von Sojaöl beobachtet. Sojaöl wurde in Konzentrationen von 0.1 bis 10 % (v/v) vor dem Autoklavieren dem Medium 1 zugegeben. Es wirkt sich vor allem auf die Bildung von Bafilomycin A_1 aus, wobei 2 % Sojaöl zu einer über 100 %igen Steigerung

von A_1 führen. Höhere Konzentrationen von Sojaöl bewirken dagegen eine verminderte Antibiotikaproduktion. Die in Abb. 8 dargestellten Proben stammen vom 8. Versuchstag; die Prozentangaben beziehen sich auf die in Kontrollkolben ohne Sojaöl gebildeten Bafilomycinmengen.

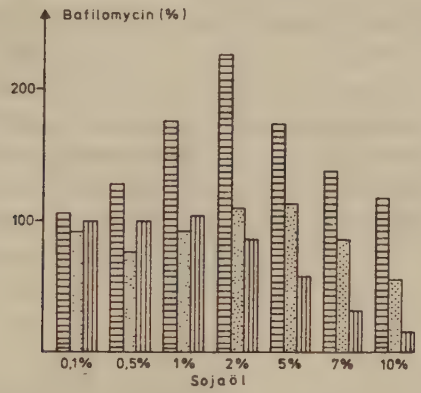


Abb. 8: Bafilomycinproduktion bei Verfütterung von Sojaöl

Bafilomycin A_1
Bafilomycin B_1
Bafilomycin C_1

3.7. Verfütterung von Vorstufen

Die Bafilomycine sind Makrolidantibiotika und werden demzufolge nach dem Muster der Polyketidbiosynthese aufgebaut. Neben C_2- und C_3-Bausteinen wird auch eine Isobutyleinheit, die wahrscheinlich von Valin herrührt, zum Aufbau des Moleküls benötigt (Hensens et al., 1983).

Die in Tabelle 2 aufgeführten Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10 mM wie unter II.6.6. beschrieben zugefüttert. Die in Kontrollkolben ohne Supplement enthaltenen Antibiotikakonzentrationen wurden als 100 % festgesetzt.

Tabelle 2: Bafilomycinproduktion bei Verfütterung von Vorstufen

Supplement	Zeitpunkt der Zugabe (Stunden)	Gesamtmenge an Bafilomycinen (in %) am 3. Tag	5. Tag	7. Tag
Ethanol	0	91	99	91
Ethanol	24	95	99	93
Propanol	0	89	107	97
Propanol	24	102	111	102
Isopropanol	0	93	93	87
Isopropanol	24	110	109	96
Butanol	0	101	114	103
Butanol	24	109	111	90
Acetat	0	90	87	87
Acetat	24	106	90	87
Propionat	0	58	66	59
Propionat	24	140	112	90
Butyrat	0	77	88	84
Butyrat	24	96	93	83
L-Valin	0	169	129	116
L-Valin	24	153	130	111
L-Valin	48	142	127	103

Die Zufütterung der Supplemente nach 24 Stunden wirkte sich nachhaltiger auf die Antibiotikaproduktion aus als die Zugabe sofort nach dem Animpfen. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Kultur bereits im letzten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase (Abb. 4). Von den verfütterten Alkoholen und Carbonsäuresalzen hatte Propionat den größten Einfluß auf die Bafilomycinproduktion, was eventuell mit dem hohen Anteil an C_3-Einheiten in der Polyketidkette begründet werden kann.

Wird die Nährlösung durch Valin supplementiert, kam es bei sofortiger Zugabe zu einer Steigerung der Bafilomycinkonzentration auf 169 %, eine spätere Verfütterung wirkte sich weniger stark aus. Noch nach 7-tägiger Kultivierung war bei Verfütterung von Valin ein erhöhter Antibiotikalevel nachweisbar.

4. Herstellung der Antibiotika

4.1. Herstellung in Schüttelkolben

Abb. 9b zeigt den über 23 Tage beobachteten und mittels HPLC-Analytik ausgewerteten Verlauf der Antibiotikaproduktion von Tü 2599. Die Bafilomycinproduktion nimmt ab dem 3. Tag mit einer konstanten Rate von etwa 4.8 mg/l in der Stunde zu. Das Maximum mit einem Antibiotikagehalt von ca. 820 mg/l wird am 10. Tag erhalten, danach sinkt die Konzentration von Bafilomycin B_1 und C_1 ab, Bafilomycin A_1 nimmt weiterhin zu. Zu diesem Zeitpunkt beginnt der Gehalt an Tubaymycin rasch anzusteigen. Da sich der pH-Wert gleichzeitig in den alkalischen Bereich verschiebt (Abb. 9a), ist die erhöhte Tubaymycinkonzentration wahrscheinlich auf alkalische Hydrolyse der Bafilomycine zurückzuführen.

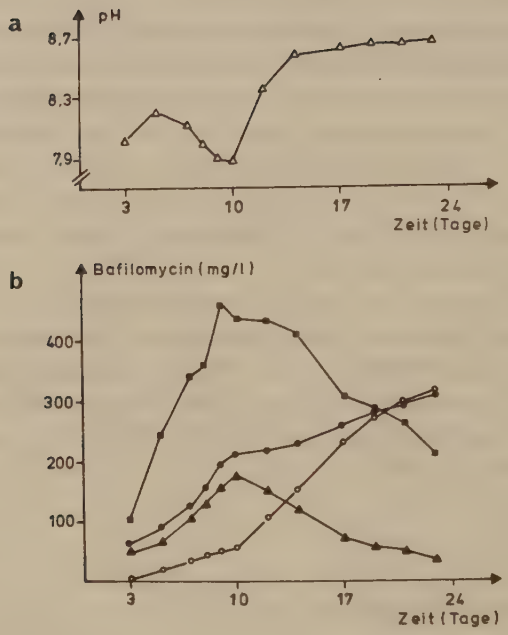


Abb. 9a: pH-Verlauf und

Abb. 9b: Produktion von Bafilomycinen und Tubaymycin in einer 23 Tage inkubierten Schüttelkolbenkultur von Tü 2599

- △ pH
- ● Bafilomycin A_1
- ▲ Bafilomycin B_1
- ■ Bafilomycin C_1
- ○ Tubaymycin

4.2. Fermentation

Größere Mengen der Antibiotika wurden in Fermentern mit 10 l, 20 l, 25 l, 100 l und 200 l Nutzvolumen hergestellt.

Wie aus Abb. 9b zu ersehen ist, würde der optimale Erntezeitpunkt bei 10 Tagen liegen. Dies ist im Fermenter wegen hartnäckiger Schaumbildung nicht durchführbar. Bis zu einer Fermentationsdauer von 5-7 Tagen kann die Schaumbildung durch wiederholte Gaben von äthanolischer Polyollösung in Griff behalten werden. Eine länger andauernde Fermentation ist nur mit Hilfe von noch größeren Mengen an Antischaummittel möglich, was sich jedoch sehr störend auf die Reinigung der Bafilomycine auswirkt (Dorgerloh, 1983). Auf Grund der geringeren Schaumbildung sind außerdem Fermenter mit Umwurfsystem den Fermentern mit Blattrührwerk vorzuziehen.

Große Schwierigkeiten bereitete bei alten Kulturen außerdem das Separieren in Kulturfiltrat und Mycel, da die Kulturbrühe durch fortgeschrittene Lyse Zellfragmente enthält, die sich nur mit großer Mühe abpressen lassen. Aus diesen Gründen wurde nicht am Produktionsoptimum geerntet, sondern je nach Fermentertyp bereits nach 3- bis 7-tägiger Fermentation.

Abb. 10 zeigt den typischen Verlauf einer unter Standardbedingungen (1000 rpm, 800 l Luft/min, 28°C) verlaufenen 25 l-Fermentation. Es konnte keine Limitierung von Wachstum und Produktion durch mangelnde Belüftung festgestellt werden.

4.3. Aufarbeitung und Reinigung

Der von Werner et al. (1984) beschriebene Aufarbeitungsgang mußte auf Grund der pH-Instabilität und der Unverträglichkeit der Bafilomycine mit Methanol überarbeitet werden. Es wurde das nachfolgend beschriebene Aufarbeitungsschema entwickelt.

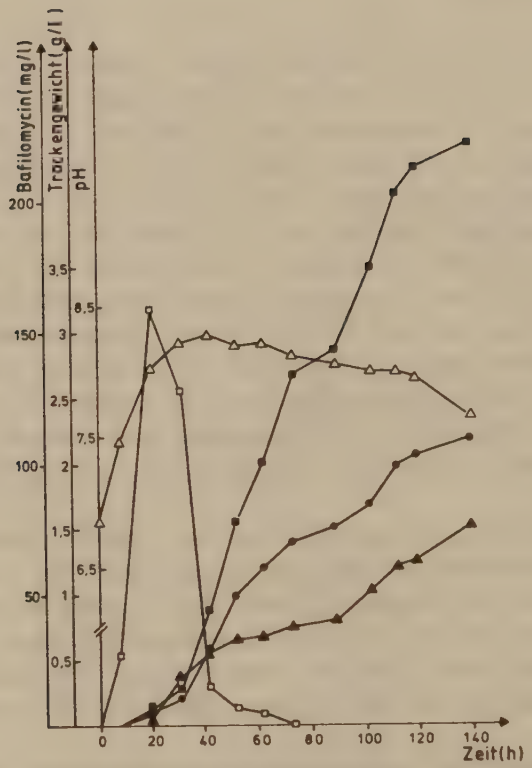


Abb. 10: Fermentationsverlauf im 25 l Fermenter

- △ pH
- □ Myceltrockengewicht
- ● Bafilomycin A_1
- ▲ Bafilomycin B_1
- ■ Bafilomycin C_1

Um das Abpressen der Kulturbrühe zu erleichtern, wurde die Kultur mit 2 % Celit (w/v) versetzt und nach Zugabe von 10 % Aceton (v/v) 30 Minuten gerührt. Damit sollten Proteine und weitere, durch Lyse der Zellen freigesetzte Substanzen, die für das rasche Verstopfen der Filterpresse verantwortlich sind, aufgeschlossen werden. Eine Adsorption der Bafilomycine aus dem Kulturfiltrat an Amberlite XAD-2 findet nur unvollständig statt. Versetzt man das Filtrat mit Aceton im Verhältnis 4:1, so gelingt eine fast vollständige Bindung an XAD-2.

Abb. 11 zeigt das Aufarbeitungsschema einer 25 l-Fermentation bis zum Rohprodukt.

Die weitere Reinigung wurde von Herrn Dipl.-Chem. M. Deeg, Arbeitskreis Prof. Hagenmaier, Organisch-Chemisches Institut, Universität Tübingen, vorgenommen. Sie bestand in mehrmaliger Chromatographie an Sephadex LH 20 (Druck 6 bar, Fließgeschwindigkeit 4 ml/min) mit Chloroform und an Kieselgel RP 18 mit Chloroform.

4.4. Bilanzierung

Die Gesamtausbeute an Antibiotika beträgt auf der Stufe der Rohextrakte 65 %, das sind im Falle einer 25 l-Fermentation etwa 6 g Bafilomycine. Die Verteilung zwischen Rohprodukt I und Rohprodukt II verhält sich wie 2:1, wobei im Rohprodukt des Mycels vor allem Bafilomycin A_1 angereichert ist. Nach Deeg (1984) beträgt die Ausbeute an Reinsubstanzen bei einer 25 l-Fermentation 780 mg A_1, 1.56 g B_1, 1.52 g C_1 und 280 mg Tubaymycin.

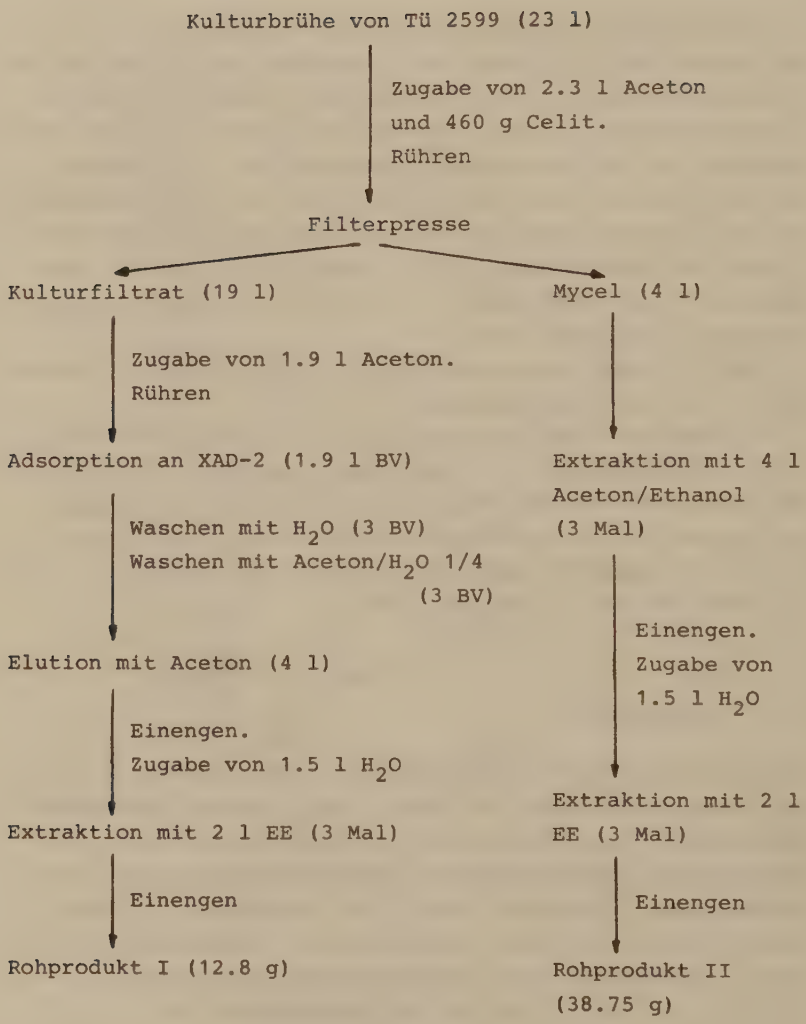


Abb. 11: Aufarbeitungsschema einer 25 l-Fermentation

5. Physikalisch-chemische Charakterisierung

Die Bafilomycine sind in organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Chloroform, Ethanol, Dioxan, Ethylacetat und DMSO gut löslich. In Methanol erfolgt bei Raumtemperatur die Umsetzung der Halbketale in die Vollketale Bafilomycin A_2, B_2 und C_2.

In einem pH-Bereich von pH 6-8 sind die Bafilomycine stabil. Die UV-Maxima des Chromophors liegen bei 254 nm und 282 nm (Werner, 1982).

5.1. Dünnschichtchromatographie

Die Bafilomycine und Tubaymycin wurden in verschiedenen Fließsystemen chromatographiert. Die Laufmittel und Rf-Werte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Rf-Werte der Bafilomycine und des Tubaymycins in verschiedenen Laufmittelsystemen

Laufmittelsystem (v/v)	Rf-Werte von Bafilomycin A_1	B_1	C_1	Tubaymycin
Aceton/Chloroform 7/3	0.64	0.32	0.06	0.70
Chloroform/Methanol 9/1	0.53	0.42	0.09	0.59
Chloroform/Dioxan 6/1	0.35	0.20	0.05	0.49
EE/Methanol/Wasser 20/4/3	0.80	0.67	0.47	0.82

Auf dem entwickelten Chromatogramm sind die Antibiotika durch Fluoreszenzlösung detektierbar. Nach Besprühen mit Methanol/HCl 37 % 1/1 (v/v) färben sich die Bafilomycine "pink" an, Tubaymycin erscheint als orangefarbener Fleck.

5.2. HPLC

Abb. 12 zeigt ein typisches Chromatogramm einer Probe von Tü 2599, die wie unter II.7.2. beschrieben aufgearbeitet wurde. Die Retentionszeiten sind für Bafilomycin A_1 5.98 min, für B_1 2.19 min, für C_1 2.46 min und für Tubaymycin 4.19 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min. Bafilomycin B_1 und C_1 sind nur durch Zusatz von PicA-Reagens durch Ionenpaarchromatographie (Meyer, 1979) als Einzelpeaks auflösbar.

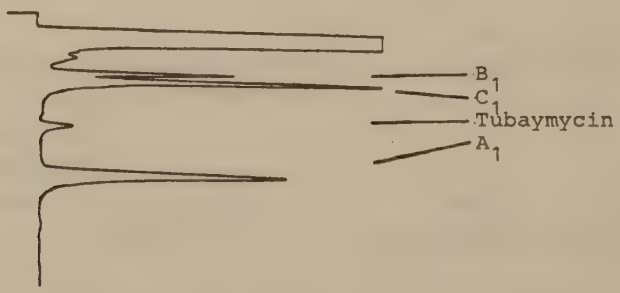


Abb. 12: HPLC-Chromatogramm einer Probe aus Tü 2599

6. Biologische Charakterisierung

6.1. Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Bafilomycinkonzentration

Die mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen im Plattendiffusionstest erhaltenen Hemmhofdurchmesser für Mucor miehei auf komplexem Medium sind in Abb. 13 dargestellt.

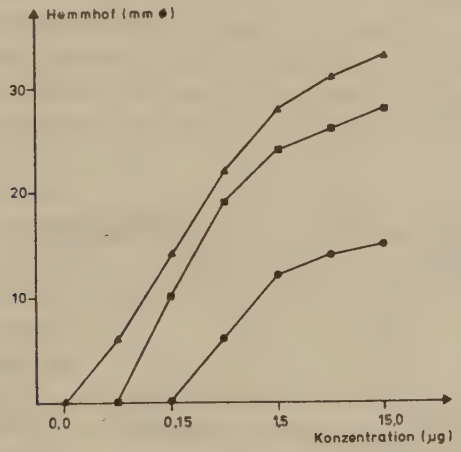


Abb. 13: Größe des Hemmhofdurchmessers in Abhängigkeit von der Bafilomycinkonzentration in µg/Testrondell

- ● Bafilomycin A_1
- ▲ Bafilomycin B_1
- ■ Bafilomycin C_1

Bis zu einer Konzentration von 0.1 mg/ml, das sind 1.5 µg Antibiotika pro Testrondell, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Hemmhofdurchmesser und dem

Logarithmus der Antibiotikakonzentration, danach nimmt die Steigung ab, was auf eine erschwerte Diffusion der recht lipophilen Antibiotika zurückzuführen ist. Die untere Nachweisgrenze im Plattendiffusionstest auf Mucor miehei liegt für Bafilomycin A_1 bei 0.01 mg/ml, für B_1 bei 0.001 mg/ml und für C_1 bei 0.03 mg/ml.

6.2. Wirkungsspektrum

Die Empfindlichkeit verschiedener Bakterien und Pilze gegen Bafilomycin A_1, B_1 und C_1 wurde im Plattendiffusionstest ermittelt. Die Konzentration der Antibiotika betrug 1 mg/ml (gelöst in Ethanol). Ein Testrondell enthielt 15 µl dieser Lösungen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Wirkungsspektrum der Bafilomycine A_1, B_1 und C_1

Organismen	Hemmhofdurchmesser der Bafilomycine		
	A_1	B_1	C_1
Bakterien			
Achromobacter geminiani	-	-	-
Agrobacterium tumefaciens	-	-	-
Arthrobacter aurescens	-	10	11
Arthrobacter crystallopoietes	-	13	14
Arthrobacter globiformis	-	14	15
Arthrobacter pascens	-	14	16
Bacillus brevis	-	9	10
Bacillus subtilis	-	-	-
Bacillus subtilis[1)]	-	Sp	13
Brevibacterium sterolicum	-	-	-

Organismen	Hemmhofdurchmesser der Bafilomycine		
	A_1	B_1	C_1
Clostridium pasteurianum	-	9	14
Corynebacterium insidiosum	-	11	9
Corynebacterium rathayi	-	-	Sp
Escherichia coli	-	-	-
Escherichia coli[1)]	-	-	-
Micrococcus luteus	-	12	14
Proteus mirabilis	-	Sp	8
Proteus vulgaris	-	-	Sp
Pseudomonas fluorescens	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-
Streptomyces antibioticus Tü 4	-	-	-
Streptomyces diastatochromogenes Tü 20	-	-	-
Streptomyces glaucescens Tü 49	-	-	Sp
Streptomyces griseus Tü 17	-	-	Sp
Streptomyces lavendulae Tü 35	-	-	-
Streptomyces prasinus Tü 30	-	Sp	Sp
Streptomyces violaceoruber Tü 22	-	-	-
Hefen und Pilze			
Alternaria mali[2)] Polyoxin sensitiv	26	>30	>30
Alternaria mali[2)] Polyoxin resistent	24	>30	>30
Aspergillus niger	-	20	19
Aspergillus terreus	-	19	18
Botrytis cinerea[2)]	18	27	24
Candida albicans	-	Sp	Sp
Candida guilliermondii	-	Sp	Sp
Candida membranaefaciens	-	-	-
Coprinus cinereus[2)]	14	>30	30
Fusarium spec.	-	25	22
Hansenula anomala	-	16	13
Lipomyces lipofer	-	17	17
Mucor hiemalis Tü 179/180	14	29	23

Organismen	Hemmhofdurchmesser der Bafilomycine		
	A_1	B_1	C_1
Mucor miehei Tü 284	14	32	29
Mucor miehei Tü 284[1)]	17	39	37
Nadsonia fulvescens	14	26	23
Neurospora crassa	9	17	15
Paecilomyces varioti	10	25	22
Penicillium puberulum	-	21	21
Pythium debaryanum[2)]	10	18	22
Rhizoctonia solani[2)]	19	29	27
Rhodotorula rubra	Sp	10	11
Saccharomyces cerevisiae Tü 125	9	17	15
Saccharomyces cerevisiae FL 200	-	13	12
Saccharomyces cerevisiae FL 599-1B	Sp	15	13
Saccharomycopsis lipolytica	-	9	9
Saprolegnia asterophora[2)]	16	29	29
Schizosaccharomyces pombe	Sp	23	17
Wingea robertsii	9	19	15

1): synthetisches Medium
2): Test an der Riesenkolonie
Sp: Spur

6.3. Morphologische Veränderungen

Unter dem Einfluß von manchen Antibiotika treten an den Hyphenspitzen von Botrytis cinerea morphologische Veränderungen auf. Es finden sich wellig verkrümmte Hyphen (Curling-Effekt), blasige Anschwellungen (Bulging-Effekt) oder vermehrte Verzweigungen, die von Hütter et al. (1965) als "Hexenbesen" bezeichnet wurden.

Auch unter Einfluß der Bafilomycine sind "Hexenbesen" an den Hyphenspitzen von Botrytis cinerea und der Bulging-Effekt bei Rhizoctonia solani feststellbar.

Abb. 14: Bildung von "Hexenbesen" an Hyphen von Botrytis cinerea nach Einwirkung von Bafilomycin A_1 (1 mg/ml)

7. Suche nach modifizierten Bafilomycinen

7.1. Verzweigtkettige Aminosäuren

Nach Hensens et al. (1983) ist Valin am Aufbau des Bafilomycinmoleküls beteiligt. Um den Einbau anderer verzweigtkettiger Aminosäuren zu erreichen, wurde dem Streptomyceten

je 10 mM L-Leucin und L-Isoleucin zugefüttert. Bei der Untersuchung der Proben mit HPLC konnten neben den bekannten Peaks von Bafilomycin A_1, B_1, C_1 und Tubaymycin keine weiteren Peaks festgestellt werden. Auch mit der Dünnschichtchromatographie konnte keine neue Verbindung identifiziert werden.

Durch Zufütterung der Aminosäuren kam es jedoch, wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, zu einer Steigerung der Bafilomycinproduktion im Vergleich zu Kontrollkolben (= 100 %).

Tabelle 5: Bafilomycinproduktion bei Verfütterung von verzweigtkettigen Aminosäuren

Supplement (10 mM)	Zeitpunkt der Zugabe (Stunden)	Gesamtmenge an Bafilomycinen (in %) am 3. Tag	5. Tag	7. Tag
L-Leucin	0	141	116	91
L-Leucin	24	142	117	97
L-Leucin	48	138	105	92
L-Isoleucin	0	165	130	107
L-Isoleucin	24	165	144	145
L-Isoleucin	48	151	106	106

7.2. Dicarbonsäuren

Bafilomycin B_1 und C_1 enthalten am C_{21}-Atom über eine Esterbindung einen substituierten bzw. unsubstituierten Fumarsäurerest. Um eine Variation dieser Säure herbeizuführen, wurde dem Stamm Dicarbonsäuren mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen

sowie Carbonsäuren des Citronensäurezyklus angeboten. Die Supplemente wurden als Lösung (pH 7.5) sofort nach dem Animpfen oder nach 35 Stunden zugefüttert. Die Endkonzentration der Supplemente betrug 10 mM. Folgende Verbindungen wurden eingesetzt: Oxalsäure, Malonsäuren, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Oxalessigsäure, α-Ketoglutarsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Citronensäure und Isocitronensäure.

In Abb. 15 sind die Ergebnisse als prozentuale Bafilomycinproduktion im Vergleich zu Kontrollkolben ohne Supplement dargestellt. Die Angaben stammen vom 5. Versuchstag; die Proben des 3. bzw. 7. Tages zeigten dieselbe Tendenz. Die gebildeten Antibiotikamengen waren in Kolben, bei denen die Zufütterung erst nach 35 Stunden erfolgt war, um durchschnittlich 10 % höher. Bei allen nicht dargestellten Dicarbonsäuren wurde keine signifikante Änderung der Antibiotikaproduktion festgestellt.

Die Produktion von Bafilomycin C_1 reagierte am empfindlichsten auf Zufütterung von Dicarbonsäuren. Nur bei Zugabe von Fumarsäure war die Konzentration an Bafilomycin C_1 erhöht, sonst immer erniedrigt und bei Verfütterung von Oxalsäure, Citronensäure und Isocitronensäure war Bafilomycin C_1 nicht mehr oder nur noch in Spuren feststellbar. Bei diesen drei Supplementen kam es zu einer über 200 %igen Steigerung der Bafilomycin B_1-Konzentration. Im HPLC- und DC-Chromatogramm war zudem eine neue Komponente auszumachen (III.8.).

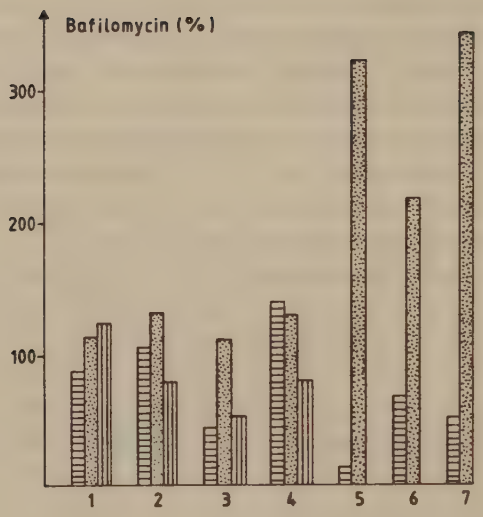


Abb. 15: Bafilomycinproduktion bei Verfütterung von Dicarbonsäuren

Bafilomycin A_1
Bafilomycin B_1
Bafilomycin C_1

1: Fumarsäure
2: Maleinsäure
3: Äpfelsäure
4: Malonsäure
5: Oxalsäure
6: Citronensäure
7: Isocitronensäure

7.3. Methionin-Antagonisten

Methionin ist ein wichtiger Methylgruppendonator im Intermediärstoffwechsel (Lehninger, 1975). Antagonisten dieser essentiellen Aminosäure können Methylierungsreaktionen

stoppen oder auch im Falle der homologen Verbindung Ethionin Ethylgruppen transferieren wie die Herstellung von 3-Demethoxy-3-Ethoxytetracenomycin C zeigt (Lazar et al., 1981).

Durch Zugabe von DL-Ethionin in Konzentrationen von 400 mg/l, 200 mg/l und 40 mg/l wurde versucht, Bafilomycine mit Ethoxygruppe am C_2- und C_{14}-Atom zu erhalten.

Ethionin ist sowohl für pro- als auch für eukaryotische Zellen extrem toxisch, da es auf viele biosynthetischen und regulatorischen Prozesse störend einwirkt (Alix, 1982). Ethionin wurde deshalb zu verschiedenen Phasen des Wachstums, nach 0, 24 und 48 Stunden den in Nährlösung 1 wachsenden Kulturen zugegeben. Konzentrationen von 400 mg/l wirkten sich stark hemmend auf das Wachstum aus und senkten die produzierte Antibiotikamenge. Bei 200 mg/l waren diese Effekte bereits reduziert und bei 40 mg/l war kein eingeschränktes Wachstum oder eine reduzierte Antibiotikabildung im Vergleich zu nicht supplementierten Kontrollkolben zu beobachten.

In Tabelle 6 sind die produzierten Bafilomycine bezogen auf Kontrollkolben (= 100 %) zusammengefaßt. Alle Proben wurden mit DC und HPLC analysisert. Es waren keine neuen Komponenten mit verändertem Fließ- bzw. Retentionsverhalten zu erkennen.

7.4. p-Aminobenzoesäureanaloga

Neben der Verfütterung von Ethionin wurde versucht, durch Hemmung der Tetrahydrofolsäure, die als Coenzym bei der Übertragung von Methylgruppen beteiligt ist, Demethylverbindungen der Bafilomycine zu erhalten. Als Strukturanaloga der p-Aminobenzoesäure wurden p-Aminosalicylsäure und p-Nitrobenzoesäure sowie die Sulfonamide Sulfadiazin, Sulfaguanidin und Sulfapyridin in Konzentrationen von je 1 mg/ml und 5 mg/ml eingesetzt. Die Antagonisten wurden nach 0, 24 oder 48 Stunden den in Nährlösung 1 wachsenden Kulturen zugegeben.

Tabelle 6: Bafilomycinproduktion bei Zugabe von DL-Ethionin

Konzentration an Ethionin	Zeitpunkt der Zugabe (Stunden)	Bafilomycine (in %) am 3. Tag	5. Tag	7. Tag
400 mg/l	0	38	56	58
400 mg/l	24	36	52	56
400 mg/l	48	35	59	63
200 mg/l	0	76	78	83
200 mg/l	24	43	65	66
200 mg/l	48	84	87	97
40 mg/l	0	129	110	102
40 mg/l	24	125	118	98
40 mg/l	48	121	106	95

p-Aminosalicylsäure und p-Nitrobenzoesäure unterdrückten sehr stark das Wachstum des Streptomyceten. Eine Bafilomycinproduktion war bei 0 Stunden-Wert nicht feststellbar. Wurden diese Antagonisten nach 24 bzw. 48 Stunden zugefüttert, so kam es wohl zur Antibiotikabildung, sie erreichte jedoch maximal 20 % des Kontrollwertes ohne Supplement.

Die Sulfonamide Sulfadiazin, Sulfaguanidin und Sulfapyridin, die von Goodmann et al. (1961) zur Herstellung von Demethylchlorotetrazyklin benutzt worden waren, hatten ebenfalls Einfluß auf den Bafilomycinproduzenten. Bei Zugabe nach 0 Stunden oder 24 Stunden waren die Antibiotika nur in Spuren nachweisbar. Wurden die Sulfonamide nach 48 Stunden zupipettiert, so kam es weder zu einer Beeinträchtigung des Wachstums noch zu einer signifikanten Änderung der Antibiotikakonzentration. Dies deckt sich mit den Erfahrungen bei der Herstellung von N-Demethyllincomycin (Argoudelis et al., 1973).

7.5. Folsäureantagonisten

Aminopterin ist ein Inhibitor der Dihydrofolsäure-Reduktase, die Dihydrofolsäure zur Tetrahydrofolsäure reduziert. Erst in Form der methylierten Tetrahydrofolsäure kann sie als Cofaktor bei Reaktionen mitwirken, bei denen Einkohlenstoffeinheiten übertragen werden (Franklin and Snow, 1973). Aminopterin wurde zu 0.1 mg/ml nach 0, 24 oder 48 Stunden zugegeben.

Bei sofortiger Verfütterung ließt sich kein Einfluß auf das Wachstum der Kultur und die Antibiotikaproduktion feststellen. Erfolgte die Zugabe nach 24 bzw. 48 Stunden, so waren die Bafilomycine nur in Spuren detektierbar.

Ebenso wie bei der Verfütterung von p-Aminobenzoesäure-Analoga waren auch bei Zugabe von Aminopterin keine neuen Verbindungen mittels DC oder HPLC nachweisbar.

8. Bafilomycin L

8.1. Herstellung von Bafilomycin L

Die als Bafilomycin L bezeichnete Verbindung kann auf mehreren Wegen erhalten werden:

- Tü 2437 produziert diese Verbindung, wobei bei 5 Mutanten mit einer höheren Ausbeute zu rechnen ist (III.2.3.)
- Kultivierung von Tü 2599 in variiertem Medium 1 mit Stärke als C-Quelle (III.3.2.)
- Verfütterung von Oxalsäure, Citronensäure oder Isocitronensäure an Tü 2599 (III.7.2.)

Diese Möglichkeiten wurden miteinander verglichen. Da mit der Mutante Tü 2437/20 die höchste Konzentration erreicht werden konnte, wurde sie zur Herstellung von Bafilomycin L

verwendet. Für die Herstellung von Bafilomycin L wurden dieselben Bedingungen wie bei den anderen Bafilomycinen gewählt (II.5.1.).

8.2. Reinigung und Isolierung

Nach 10-tägiger Inkubation wurde die Kultur nach dem Bafilomycinschema (Abb. 11) aufgearbeitet. Das einrotierte Amberlite XAD-2-Eluat und das Mycelrohprodukt wurden zunächst durch Chromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform vorgereinigt. Mit einer zweiten LH 20-Säule konnten auch Bafilomycin C_1 und Bafilomycin L, die an LH 20 ein ähnliches Verhalten zeigen, getrennt erhalten werden. Die Überprüfung der Fraktionen erfolgte mit DC und HPLC. Die Fraktionen, die laut HPLC zu mehr als 90 % aus Bafilomycin L bestanden, wurden einrotiert und dienten zur biologischen und physikalisch-chemischen Charakterisierung.

8.3. Physikalisch-chemische Charakterisierung

Bafilomycin L ist in organischen Lösungsmitteln gut löslich. Es verhält sich bezüglich seines Adsorptionsverhaltens an Amberlite XAD-2 wie die Bafilomycine. Die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchung in verschiedenen Fließsystemen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Als Vergleich diente Bafilomycin C_1, dem es am ähnlichsten zu sein scheint.

Bafilomycin L kann durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und durch Besprühen mit Methanol/HCl 37 % (v/v) als pinkfarbener Fleck identifiziert werden.

Abb. 16 zeigt das HPLC-Chromatogramm einer Probe der Mutante Tü 2437/20. Bei den unter II.7.2. angegebenen Bedingungen und einer Durchflußgeschwindigkeit von 2 ml/min

hat Bafilomycin A_1 eine Retentionszeit von 5.98 min, B_1 von 2.19, C_1 von 2.46, Tubaymycin von 4.19 und Bafilomycin L von 2.72 min.

Tabelle 7: Rf-Werte von Bafilomycin L und C_1 in verschiedenen Laufmitteln

Laufmittelsystem (v/v)	Bafilomycin L	Bafilomycin C_1
Aceton/Chloroform 7/3	0.02	0.06
Chloroform/Methanol 9/1	0.03	0.09
Chloroform/Dioxan 6/1	0.01	0.05
EE/Methanol/Wasser 20/4/3	0.34	0.47

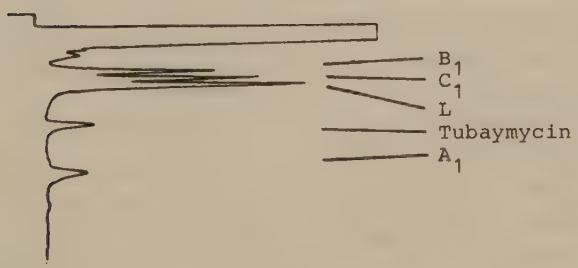


Abb. 16: HPLC-Chromatogramm einer Probe aus Tü 2437/20

Die Strukturaufklärung von Bafilomycin L steht noch aus, doch deuten die vorhandenen Daten darauf hin, daß es sich bei dieser neuen Verbindung um ein Bafilomycinderivat handeln muß.

8.4. Biologische Charakterisierung

Mit dem Plattendiffusionstest wurde die biologische Wirkung von Bafilomycin L auf bestimmte Mikroorganismen untersucht.

Tabelle 8: Wirkungsspektrum von Bafilomycin L und A_1

Organismen	Hemmhofdurchmesser der Bafilomycine	
	L	A_1
Arthrobacter pascens	13	-
Bacillus brevis	10	-
Clostridium pasteurianum	11	-
Micrococcus luteus	13	-
Aspergillus niger	15	-
Botrytis cinerea	16	18
Mucor hiemalis TÜ 179/180	15	14
Mucor miehei Tü 284	16	14
Mucor miehei Tü 284[1)]	21	17
Paecilomyces varioti	14	10
Pythium debaryanum	12	10
Rhizoctonia solani	18	19
Saccharomyces cerevisiae Tü 125	12	9
Saprolegnia asterophora	21	16

1): synthetisches Medium

Bafilomycin L wurde wie das zu Vergleichszwecken mitgetestete Bafilomycin A_1 in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol gelöst, eingesetzt. Ein Testrondell enthält somit 15 µg Antibiotikum.

Wie aus Tabelle 8 zu ersehen ist, zeigt die neue Verbindung etwa dasselbe Wirkungsspektrum wie die bereits bekannten Bafilomycine. Sie ist in der Wirksamkeit zwischen Bafilomycin A_1 und C_1 einzustufen, d.h. sie ist stärker wirksam als A_1 aber schwächer als C_1.

9. Untersuchungen zur Wirkungsweise

9.1. Streifengradiententest

Ionophore Antibiotika wie Valinomycin, Nigericin und die Makrotetrolide sind in der Lage, den Kaliumhaushalt der Zelle zu stören. Durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration läßt sich die Wirkung der Antibiotika aufhaben (Harold and Baarda, 1967, 1968).

Mit dem Streifengradiententest wurde die Abhängigkeit der Empfindlichkeit des Testorganismus gegenüber den Bafilomycinen von der K^+-Konzentration im Medium untersucht.

Auf den Kaliumgradientenplatten konnten entlang des mit einer Bafilomycinlösung (1 mg/ml) getränkten Papierstreifens keine unterschiedlich breiten wachstumsfreien Zonen erkannt werden. Eine Verminderung der antifungischen Wirkung durch Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration konnte somit nicht nachgewiesen werden.

9.2. Wirkung der Antibiotika auf Liposomen

Für die Untersuchung von Diffusionsvorgängen an biologischen Membranen sind Liposomen als Modellsysteme geeignet (Bangham et al., 1965). Liposomen sind kleine Lipidvesikel, die durch Beschallen von Phosphatidylcholin erhaltenen werden können. Im Idealfall bestehen sie aus einer einzelnen Bilayerschicht und sind mit wässriger Salzlösung, in diesem Fall mit 0.5 M Kaliumphosphat, gefüllt.

Ionophore Eigenschaften von Antibiotika können durch Messung von pH-Änderungen im Außenmedium der Liposomen erkannt werden. Rufen Antibiotika eine Permeabilitätsänderung der Membran hervor, so erfolgt ein Austausch von K^+ gegen H^+ und der pH-Wert des Außenmediums wird erhöht. Die Geschwindigkeit und die Höhe der vom Schreiber aufgezeichneten pH-Änderung ist von der Konzentration der zugegebenen Antibiotika abhängig. Hemmstoffe von Na^+- oder K^+-Pumpen wie Ouabain (Chipperfield and Whittam, 1973) haben keinen Einfluß auf diesen Test, da Liposomen als künstliche Membranen keine Na^+- oder K^+-Pumpen besitzen.

In Abb. 17 und 18 sind die durch Zugabe von verschiedenen Bafilomycinkonzentrationen zu den Liposomen erhaltenen pH-Änderungen dargestellt. Vor Zugabe der Antibiotikalösung wurde der Meßansatz mit CCCP (1 mg/ml Ethanol), einem effektiven Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung versehen (Heytler, 1963).

Bafilomycin B_1 bewirkt bis in Konzentrationen von 1 µg/ml, das ist eine Endkonzentration von 3 ng/ml im Meßansatz, den Ausfluß von Kaliumionen aus den Liposomen. Bafilomycin C_1 und Tubaymycin sind um etwa zwei Zehnerpotenzen schwächer wirksam als B_1, bei Bafilomycin A_1 steigt der pH-Wert des Außenmediums innerhalb der gemessenen Zeit nur wenig an.

Um die Bafilomycine einer bestimmten Gruppe von ionophoren Antibiotika zuordnen zu können, wurden sie mit und ohne Zusatz von CCCP getestet. Als Vergleich dienten Valino-

mycin, Nigericin und Nonactin. Die Ergebnisse von Bafilomycin B_1, Nigericin und Valinomycin sind den Abb. 19a bis 19d zu entnehmen.

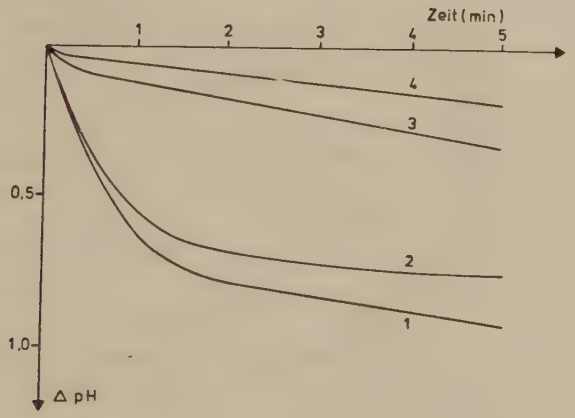


Abb. 17: Änderung des pH-Wertes im Außenmedium nach Zugabe von Bafilomycin A_1, C_1 und Tubaymycin

1: Tubaymycin 3 µg/ml (Endkonzentration)
2: Bafilomycin C_1 3 µg/ml (Endkonzentration)
3: Tubaymycin 0.3 µg/ml (Endkonzentration)
4. Bafilomycin A_1 3 µg/ml (Endkonzentration)

Bei höher konzentrierter Lösung von B_1 (1 mg/ml) ist der Ausstrom von K^+ aus den Liposomen mit und ohne CCCP-Zugabe fast gleich. Bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml Bafilomycin B_1 wurde dagegen der typische Verlauf eines Ionophors

der Valinomycingruppe beobachtet, was erst nach Zugabe eines Protonentranslokators voll wirksam wird.

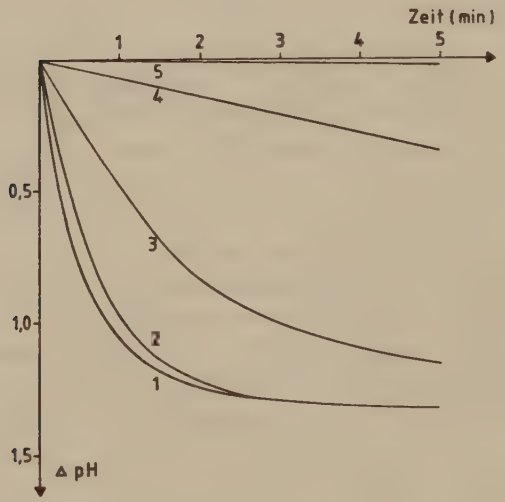


Abb. 18: Änderung des pH-Wertes im Außenmedium der Liposomen nach Zugabe von Bafilomycin B_1

1: Bafilomycin B_1 3 µg/ml (Endkonzentration)
2: Bafilomycin B_1 0.3 µg/ml (Endkonzentration)
3: Bafilomycin B_1 0.03 µg/ml (Endkonzentration)
4: Bafilomycin B_1 0.003 µg/ml (Endkonzentration)
5: Bafilomycin B_1 0.0003 µg/ml (Endkonzentration)

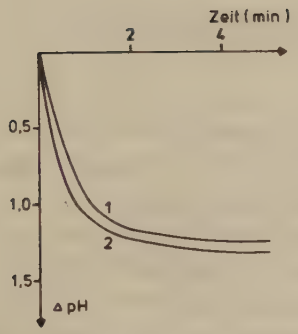


Abb. 19a: B_1 (1 mg/ml)

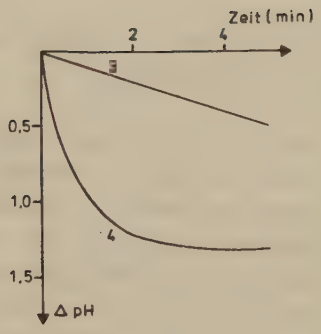


Abb. 19b: B_1 (0.1 mg/ml)

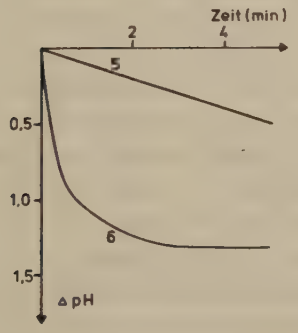


Abb. 19c: Valinomycin

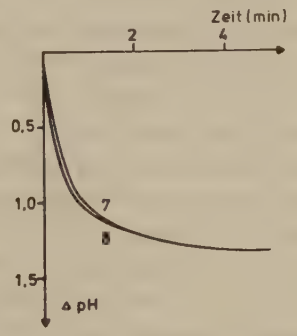


Abb. 19d: Nigericin

Abb. 19a-d: Änderung des pH-Wertes im Außenmedium von Liposomen nach Zugabe von Bafilomycin B_1 (0.1 bzw. 1 mg/ml), Valinomycin (1 mg/ml) und Nigericin (1 mg/ml) mit und ohne CCCP

1: B_1 (1 mg/ml) ohne CCP
2: B_1 (1 mg/ml) mit CCCP
3: B_1 (0.1 mg/ml) ohne CCCP
4: B_1 (0.1 mg/ml) mit CCCP
5: Valinomycin ohne CCCP
6: Valinomycin mit CCCP
7: Nigericin ohne CCCP
8. Nigericin mit CCCP

9.3. Wirkung der Antibiotika auf die Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere

Für den Aktivitätsnachweis von Na^+K^+-ATPasen stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Barnett (1970) beschreibt einen Test, bei dem die Hydrolyse von ATP indirekt über zwei enzymatische Reaktionen zur Oxidation von $NADH_2$ führt, was photometrisch zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden kann. Eine empfindlichere Methode ist die kolorimetrische Bestimmung des durch Reduktion des Phosphormolybdatkomplexes entstandenen Molybdänblau. Nach Chen et al. (1956) sind damit Phosphatkonzentrationen bis zu 50 ng/ml nachweisbar.

Mit der unter II.9.3. beschriebenen Versuchsanordnung sollte nachgewiesen werden, daß die Bafilomycine Inhibitoren von Na^+K^+-ATPasen sind.

Die Bafilomycine und Tubaymycin wurden in Konzentrationen von 0.001 mg/ml bis 10 mg/ml (in DMSO gelöst) eingesetzt. Das entspricht etwa 0.01 µMol bis 100 µMol Antibiotikum pro Reaktionsansatz. Bei einer Konzentration von 1 µMol verursacht Bafilomycin A_1 eine Enzyminhibition von 4.6 %, B_1 von 13.5 %, C_1 von 13.0 % und Tubaymycin von 6.8 % (Abb. 20).

Das als Inhibitor von Na^+K^+-ATPasen bekannte Herzglykosid Ouabain bewirkt bei einer Konzentration von 1 µMol einen Aktivitätsverlust des Enzyms von 17 %. Demnach ist die Wirksamkeit der Bafilomycine B_1 und C_1 um gut 20 % geringer als die des Ouabains. Tubaymycin zeigt 40 % und Bafilomycin A_1 nur noch 27 % der Wirksamkeit des Ouabains.

9.4. Wirkung der Antibiotika auf die K^+-ATPase aus E. coli

Der große Vorteil der automatisierten Testanordnung (II.9.4.) liegt darin, daß der zeitliche Ablauf der Enzymreaktion kontinuierlich verfolgt werden kann. Die Aktivitätsverminderung des Enzyms kann durch Vergleich der Steigungen der vom Schreiber aufgezeichneten Kurven berechnet werden.

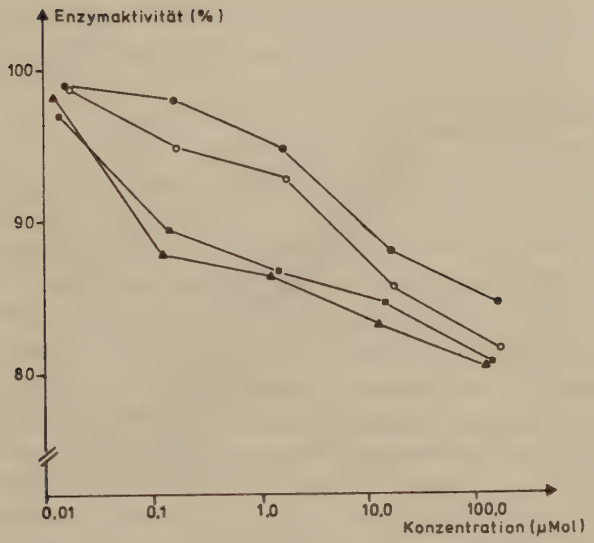


Abb. 20: Inhibition der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere unter Einwirkung der Bafilomycine

- ● Bafilomycin A_1
- ▲ Bafilomycin B_1
- ■ Bafilomycin C_1
- ○ Tubaymycin

Unter Einwirkung der Bafilomycine kam es zu einem deutlichen Aktivitätsverlust der K^+-ATPase aus E. coli. Bei einer Konzentration von 100 µMol Antibiotikum im Reaktionsansatz ist das Enzym bei Bafilomycin B_1 und C_1 vollständig gehemmt, bei A_1 ist noch 6 % Restaktivität vorhanden (Abb. 21). Der K_I-Wert der Bafilomycine liegt im Bereich von 1.1 bis 3.8 µMol.

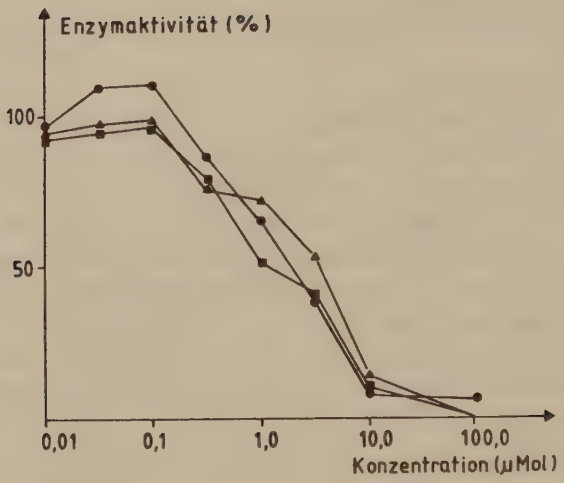


Abb. 21: Inhibition der K^+-ATPase aus E. coli unter Einwirkung der Bafilomycine

● Bafilomycin A_1
▲ Bafilomycin B_1
■ Bafilomycin C_1

H^+-ATPasen bestehen aus einem membrangebundenen F_o-Teil, der den protonenleitenden Kanal bildet, und aus einem katalytischen Zentrum F_1 (Smith and Sternweis, 1977). Sie unterscheiden sich demnach in ihrem strukturellem Aufbau als auch in ihrer Funktion von den alkalimetallionentransportierenden ATPasen (Froelich et al., 1976).

Die Bafilomycine zeigten keine Wirkung auf eine aus E. coli isolierte Protonen-ATPase. Bei einer Konzentration von 10 µMol war die Enzymaktivität noch zu 100 % erhalten.

IV. DISKUSSION

1. Biosynthese von Makroliden

Nach Woodward (1957) sind Makrolide eine Klasse von antibakteriell wirkenden Antibiotika, die über zwei gemeinsame Strukturelemente verfügen. Dies sind ein 12-, 14- oder 16-gliedriger makrozyklischer Laktonring und 1 bis 3 daran gebundene Amino- bzw. Desoxyzucker. Komponenten, die mehr als zwei konjugierte Kohlenstoffdoppelbindungen besitzen, sind bereits der Klasse der antifungisch wirkenden Polyenen zuzuordnen (Hamilton-Miller, 1973). Zur Gruppe der "klassischen Makrolide" gehören u.a. die Leucomycine (Hata et al., 1953), Pikromycin (Brockmann and Oster, 1957), die Erythromycine (Wiley et al., 1957) und Tylosin (Hamill et al., 1961).

Durch die Beschreibung von Makroliden mit atypischen oder mehrzyklischen Laktonringen wie die Avermectine (Burg et al., 1979), Milbemycine (Takiguchi et al., 1980), Nargenicine (Celmer et al., 1980), Copiamycine (Fukushima et al., 1982) und das Irumamycin (Omura et al., 1982) müssen neue Kriterien für eine Definition der Makrolide erstellt werden.

Allen Makroliden gemeinsam ist der Aufbau des Aglykons aus Acetat- und Propionat-Einheiten und seltener aus Butyrat-Einheiten. Die durch Carboxylierung von Acetat und Propionat entstandenen Malonat- bzw. Methylmalonat-Einheiten werden in Form ihrer Coenzym A-Ester mit einem variablen Startermolekül beginnend kettenförmig aneinander geknüpft (Martin, 1977). Von den daraus entstehenden Poly-β-Ketosäuren leitet sich die Bezeichnung Polyketide ab, die heute als Überbegriff für alle aus Acetat- und Propionat-Einheiten aufgebauten Sekundärmetabolite verwendet wird (BuLock, 1965).

Nach Martin and Demain (1980) können Sekundärstoffwechselprodukte durch spezielle Synthetasen oder unter Ausnutzung des Enzymapparates des Primärstoffwechsels gebildet werden. Ein Beispiel für einen verzweigten Stoffwechselweg mit fast denselben Vorstufen und ähnlichen biosynthetischen Enzymen, der zum einen zu Primärmetaboliten und zum anderen zu Sekundärmetaboliten führt, ist die Fettsäure- und Polyketidbiosynthese.

Die Fettsäuresynthese findet an einem Multienzymkomplex statt, wo SH-Gruppen des Carrier- und des Kondensationsenzyms zur Bindung der Vorstufen zur Verfügung stehen. Die Fettsäuresynthetase gehorcht dem "Alles oder nichts"-Prinzip. Diese Merkmale wurden auch für die Polyketidsynthetase gefunden (BuLock, 1979). Die nichtribosomale Peptidbiosynthese von Peptidantibiotika wie Gramicidin S verläuft ebenfalls an einem Multienzymkomplex und zeigt gewisse Ähnlichkeiten zur Polyketidbiosynthese (Kleinkauf and Gevers, 1969).

Die Unterschiede der Enzymkomplexe von Fettsäure- und Polyketidsynthese liegen im Reduktionsgrad der Produkte und in der Spezifität der Transacylasen. Die Spezifität der Polyketid-Transacylasen ist geringer; sie akzeptieren deshalb im Gegensatz zu den Fettsäure-Transacylasen auch Methylmalonyl-CoA als Baustein. Die Methylgruppen der iso- und ante-iso-Fettsäuren stammen biogenetisch von Aminosäuren ab (Concoran, 1965).

Bei der Fettsäuresynthese werden alle Ketomethylen-Einheiten voll reduziert. Der Aufbau der Kette ist somit eine sukzessive Acylierung von gesättigten Acylhomologen. Im Unterschied dazu sind bei der Polyketidbiosynthese die Reduktionsschritte inkomplett durchgeführt oder fehlen ganz. Dies bewirkt zusammen mit den verschiedenen Bausteinen eine große Variationsbreite beim Kettenaufbau.

Die Stabilisierung und Modifizierung von Poly-β-Ketosäuren kann durch eine Vielzahl von chemischen Reaktionen erfolgen.

Neben der bereits angesprochenen Variation der Bausteine

sowie deren Anzahl ist das Ausmaß und die Lage der erfolgten Reduktionsschritte für eine spätere Cyclisierung oder Faltung der Kette von Bedeutung.

Eine weitere Variation wird durch Dehydrierungen erreicht, die zu einer Aromatisierung führen können wie das Beispiel der Anthrachinone zeigt (Takeda et al., 1973).

Reduktionen, Dehydrierungen und teilweise auch Cyclisierungen finden während des Aufbaus der Polyketide am Multienzymkomplex statt. Eine weitere Reaktion, die bereits in dieser Aufbauphase vorgenommen wird, ist die O- bzw. C-Methylierung mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator und einer spezifischen Transmethylase, die Teil des Multienzymkomplexes ist (BuLock, 1979).

Die Zahl der Variationsmöglichkeiten steigt in gewaltige Höhen, betrachtet man desweiteren die Modifikationen, die durch zusätzlich eingeführte Sauerstoffunktionen, Halogenierung mit Chlor oder Brom, Dimerisierung, Decarboxylierung oder Herausschneiden eines Kettenstückes zustande kommen. Außerdem können Bausteine aus anderen Quellen wie Zucker oder Aminosäuren mit dem Polyketidteil verbunden sein.

In Abb. 22 ist der Aufbau der hypothetischen Poly-β-Ketosäure dargestellt, die für das Bafilomycinmolekül zu erwarten wäre. Die Kette besteht aus 4 Acetat- und 7 Propionat-Einheiten sowie einer Isobutylat-Einheit als Startermolekül.

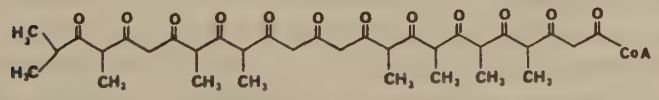


Abb. 22: Hypothetische Poly-β-Ketosäure des Bafilomycinmoleküls

Ergänzt man die Poly-β-Ketosäure mit den tatsächlich im Bafilomycinmolekül vorkommenden chemischen Gruppen, so ergibt sich das in Abb. 23 dargestellte Bild.

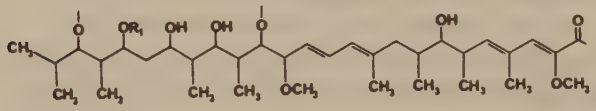


Abb. 23: Polyketidkette des Bafilomycinmoleküls

Viele der besprochenen Variationsmöglichkeiten finden sich in der Polyketidkette der Bafilomycine wieder. Die Kette ist weitgehend reduziert; es wurde dehydratisiert, zusätzliche Sauerstoffunktionen eingeführt und methyliert. Bei Bafilomycin C_1 und B_1 kam es zu einer Verknüpfung mit einem Fumarsäure- bzw. Fumarsäureamidrest.

Es zeigt sich, daß das Spiel mit den Variationsmöglichkeiten nicht allein der menschlichen Vorstellungskraft entspringt, sondern daß im Sekundärstoffwechsel ein Freiraum für biochemische Evolution zu sehen ist (Zähner, 1979).

An die Kenntnis des Biosyntheseweges der Bafilomycine wurden verschiedene Erwartungen geknüpft.

Nach Omura (1983) ist bei den 16-gliedrigen Makroliden mit 72 Gruppen zu rechnen, die sich durch die Sequenz der Bausteine bei der Aglykonbiosynthese unterscheiden. Durch Kenntnis des biosynthetischen Aufbau der Bafilomycine sollten strukturelle Verwandschaften zu anderen Makroliden deutlicher erkannt werden. Ein Vergleich der biologischen Wirkungen von nah verwandten Verbindungen könnte dann Hinweise auf Struktur-Wirkungsbeziehungen erbringen.

Um über "directed biosynthesis" zu neuen Bafilomycinen zu gelangen, bedarf es der Kenntnis des Biosyntheseweges. Dann können mit Inhibitoren gezielt bestimmte Reaktionen der Biosynthese unterbunden werden, was die Bildung von modifizierten Antibiotika zur Folge hätte. Außerdem können chemisch modifizierte Vorstufen angeboten werden, um so zu neuen Verbindungen zu gelangen (Demain, 1981).

2. Verwandte Makrolide und deren biologische Wirkung

Die strukturelle Verwandschaft von Makroliden ist besonders gut zu erkennen, wenn die Laktonringe als lineare Polyketidketten dargestellt werden. Abb. 24 a bis Abb. 24 e zeigt schematisch in Projektionsformeltechnik die Polyketidketten von Bafilomycin A_1, Hygrolidin, Avermectin B_{1a}, Concanamycin A und Venturicidin A. Die Ähnlichkeiten, die durch das Aneinanderknüpfen von C_2-, C_3- und C_4-Bausteinen bedingt ist, und die erwähnten Variationsmöglichkeiten treten deutlich zu Tage.

Auffallend ist die außergewöhnliche Struktur der Startermoleküle, die in den Abbildungen als unterer Abschluß der Kette zu erkennen ist. Es sind verzweigte und unverzweigte Moleküle mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen. In der Familie der Milbemycine wurden allein 3 verschiedene Startermoleküle bei sonst fast identischem Molekülaufbau gefunden (Mishima et al., 1975; Takiguchi et al., 1980; Mishima et al., 1983).

Die Aglykone der Avermectine sind mit denen der Milbemycine so gut wie identisch. Die Avermectine besitzen gute antiparasitische Wirkung. Sie wirken als γ-Aminobuttersäure-Antagonist oder setzen diesen Neurotransmitter aus presynaptischen Nervenenden frei. Sie blockieren so die Übertragung zwischen Interneuronen und exitatorischen Motoneuronen und zwischen inhibitorischen Motoneuronen und Muskeln (Fritz et al., 1979; Kass et al., 1980).

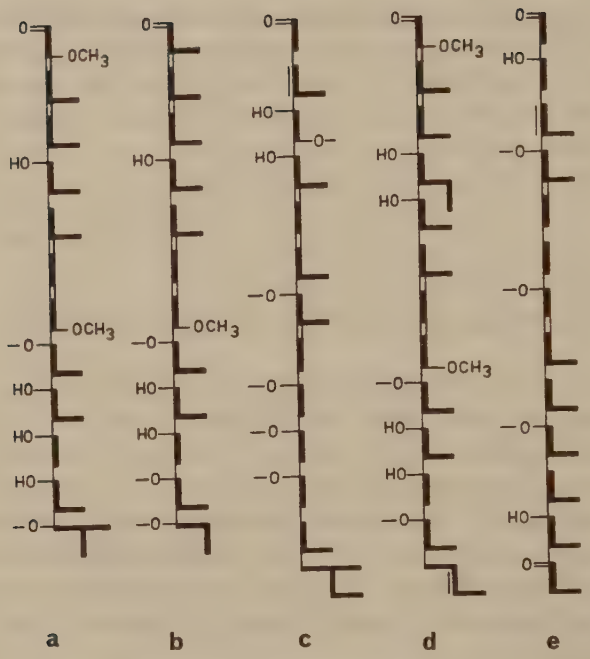


Abb. 24a-e: Projektionsformeln der Polyketidketten von

a: Bafilomycin A_1
b: Hygrolidin
c: Avermectin B_{1a}
d: Concanamycin A
e: Venturicidin A

Acetat-Einheit
Propionat-Einheit
Kohlenstoffeinfachbindung
Kohlenstoffdoppelbindung

Venturicidin A, das dem von Omura et al. (1982) beschriebenen Irumamycin sehr ähnlich ist, hemmt die Mitochondrienaktivität (Brufani et al., 1972).

Aus Abb. 24 ist die große Ähnlichkeit der Polyketidketten von Bafilomycin A_1 zu Hygrolidin und Concanamycin A gut zu erkennen.

Hygrolidin unterscheidet sich von Bafilomycin A_1 nur durch das Startermolekül und durch Ersatz einer Methoxygruppe durch eine Methylgruppe. Hygrolidin wurde bei einem Screening nach Metaboliten mit Antitumorwirkung entdeckt (Seto et al., 1982). Inzwischen sind auch Derivate wie das Defumarylhygrolidin und das Hygrolidinamid isoliert worden (Seto et al., 1984).

Bei Prasinon B, von Box et al. (1973) als insektizid wirkendes Makrolid beschrieben, handelt es sich um ein Hygrolidinderivat mit demselben Substituenten am C_{21} wie Bafilomycin B_1 (Hagenmaier, 1984).

Der ungewöhnliche Fünferring des Bafilomycin B_1 in Kombination mit dem Hygrolidingrundkörper bzw. einem gering variierten wurde auch bei zwei weiteren insektizid und antiparasitisch wirkenden Substanzen wiedergefunden (Hernandez, 1983; Goetz et al., 1983).

Concanamycin A, ein 18-gliedriges Makrolid, hat im Vergleich zu Bafilomycin A_1 ein variiertes Startermolekül und eine zusätzliche C_4-Einheit in der Polyketidkette. Es inhibiert die durch Concanavalin A stimulierte Proliferation von Mäuselymphozyten; es hat also immunsuppressive Wirkung (Kinashi et al., 1981).

Der Aufbau der Polyketidkette von Virustomycin A entspricht dem von Concanamycin A. Die beiden Verbindungen unterscheiden sich nur durch die Substitution an einem C-Atom. Virustomycin A ist aktiv gegen Trichonomaden, verschiedene RNA- und DNA-Viren und hat schwache antifungische Wirkung (Omura et al., 1983).

Eine Kombination aus Bafilomycingrundkörper und Zucker-

resten stellen die beiden aus Streptomyces olivaceus isolierten Antibiotika dar (Blank, 1984). Es handelt sich dabei um das Bafilomycin-L-rhamnosid und das Bafilomycin-2-O-methyl-L-rhamnosid, das dem von Isogai et al. isolierten Leucanicidin entspricht (Isogai et al., 1984).

Die aufgezeigte strukturelle Verwandtschaft dieser Makrolide läßt gemeinsame Wirkorte und Wirkungsmechanismen vermuten.

Da die Test zur biologischen Wirkung der Verbindungen von verschiedenen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt wurden, müssen vergleichende Aussagen über die biologischen Aktivitäten dieser Makrolide äußerst kritisch bewertet werden.

Durch die aufgezeigte große Anzahl an nah verwandten Substanzen bietet sich nun jedoch die Möglichkeit, mit gezielten Versuchen in der Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen einen Schritt weiterzukommen.

3. Optimierung der Bafilomycinproduktion

Zu den äußeren Faktoren, die die Produktion von Sekundärmetaboliten beeinflussen, gehören physikalische Parameter wie Temperatur, Belüftung und pH-Wert.

Der Bafilomycinproduzent Tü 2599 toleriert verschiedene Belüftungsraten ohne größere Veränderung des Antibiotikagehaltes.

Der pH-Wert sollte aus Stabilitätsgründen in einem Bereich von pH 6 bis pH 8.5 gehalten werden. In einer ohne pH-Regulation verlaufenden Fermentation bewegt sich der pH innerhalb dieses Bereiches; eine Antibiotikaproduktion findet erst ab pH 7 statt.

Die Bafilomycine unterscheiden sich in ihrem Temperaturoptimum, wobei das der beiden substituierten Derivate

Bafilomycin B_1 und C_1 um etwa 5°C höher liegt als das von Bafilomycin A_1. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die für die Ankopplung der Fumarsäure bzw. des Fumarsäureamids zuständigen Enzyme erst bei höheren Temperaturen ihre volle katalytische Tätigkeit entfalten können. Da die Bildung von Bafilomycin B_1 und C_1 nicht proportional verläuft, kann vermutet werden, daß der 2-Aminocyclopentan-1,3-dion-Ring limitiert vorliegt.

Entscheidenden Einfluß auf die Bafilomycinbildung hat die Zusammensetzung des Nährmediums. Die hohe Antibiotikaproduktion in Medium 1 ist darauf zurückzuführen, daß dessen Zusammensetzung die von Demain (1979) aufgestellten Forderungen erfüllt. Durch eine langsam verwertbare C-Quelle wie Mannit und durch das ebenfalls langsam abbaubare zudem phosphatarme Sojamehl wird eine Katabolit- und Phosphatrepression umgangen. Die Ergebnisse zeigen, daß es durch Variation des Mediums möglich ist, auf die Zusammensetzung der gebildeten Antibiotika Einfluß zu nehmen und gezielt ein bestimmtes Bafilomycinderivat als Hauptkomponente zu produzieren.

Neben der allgemeinen Variation des Mediums wurde versucht, durch Zufütterung von biosynthetischen Vorstufen zu einer Produktionssteigerung zu kommen.

Fettsäuren werden durch β-Oxidation zu Acetyl-CoA-Einheiten abgebaut und stehen somit der Polyketidbiosynthese zur Verfügung. Die durch Zugabe von Sojaöl beobachtete Produktsteigerung ist somit auf eine Erhöhung des Vorstufenpools zurückzuführen. Bei höheren Konzentrationen an langkettigen Fettsäuren kommt es durch Feedback-Regulation zur Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase, die die Reaktion von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA katalysiert (Martin and McDaniel, 1977).

Die Verfütterung von C_2-, C_3- und C_4-Körpers führte zu keiner nenenswerten Steigerung der Antibiotikaproduktion. Das Nährstoffangebot im komplexen Medium ist wahrschein-

lich ausreichend, so daß die Bafilomycinproduktion von Seiten der Acetat- und Propionat-Einheiten keine Limitierung erfährt.

Eine Zunahme der Bafilomycinproduktion wurde jedoch bei der Verfütterung von L-Valin beobachtet. Nach Hensens et al. (1983) leitet sich von dieser Aminosäure die als Startermolekül fungierende Isobutylat-Einheit ab. Auch bei der Biosynthese von Leucomycin und Tylosin wurde Valin eine Rolle als regulativer Effektor oder als Vorstufe für die Makrolidaglykone zugesprochen (Omura et al., 1983). Der Abbau des Valins zum Succinyl-CoA erfolgt über Isobutyrat-CoA und Propionat-CoA. Die gesteigerte Bafilomycinproduktion könnte demzufolge auf das Bereitstellen des Startermoleküls und von C_3-Einheiten zurückgeführt werden. Denkbar wäre auch eine Zunahme an verzweigtkettigen Fettsäuren bei Verfütterung von L-Valin. Dies würde die Permeabilität der Zellwand beeinflussen und somit die Erhöhung des Antibiotikalevels begründen.

4. Biologische Variation des Bafilomycinmoleküls

Das Auffinden neuer Antibiotika mit klassischen Methoden wird rein statistisch betrachtet immer unwahrscheinlicher. Neben dem Einsatz von neuen Sceeningmodellen ist es daher sinnvoll, bereits bekannte Substanzen zu modifizieren. Damit könnten Verbesserungen wie z.B. ein breiteres Wirkungsspektrum, erhöhte Effizienz gegen resistente Organismen, größere Stabilität, verbesserte Resorption und Reduzierung der Toxizität erreicht werden.

Die Bafilomycine zeigen gute Wirkung gegen Insekten und Milben; auch ihre Aktivität gegen phytopathogene Pilze machen sie für einen Einsatz im Pflanzenschutz interessant. Gegen eine Anwendung spricht jedoch die hohe Toxizität. Die

LD_{50} der Maus bei oraler Gabe der Antibiotika beträgt für Bafilomycin A_1 250 mg/kg Körpergewicht, für B_1 7 mg/kg und für C_1 27 mg/kg. Als Vergleich dazu die Werte von anderen Insektiziden: der LD_{50}-Wert von DDT liegt bei 113 mg/kg und von Parathion bei 6.4 mg/kg (British crop protection council, 1969).

Die Bafilomycine A_1, B_1 und C_1 unterscheiden sich strukturell nur durch unterschiedliche Substitution am C_{21}-Atom. Die veränderten Substituenten bewirken jedoch, wie aus den LD_{50}-Werten zu ersehen ist, bereits beträchtliche Unterschiede in der Toxizität. Dies läßt vermuten, daß es durch Variation des Moleküls möglich sein sollte, bei Erhalt der gewünschten fungiziden und insektiziden Wirkung, die Toxizität abzuschwächen und somit in Bereiche zu gelangen, die eine Anwendung im Pflanzenschutz zulassen würden.

Modifikationen können sowohl mit chemischen als auch mit biologischen Methoden durchgeführt werden. Die von der Natur bereits variierte Stelle am C_{21}-Atom erwies sich auch bei chemischen Reaktionen als reaktivstes Zentrum. Alle bisher synthetisierten Verbindungen (Methyläther-, Capyrl-, Maleinyl- und Citragonylderivate) zeigten deutlich verringerte Aktivität im Plattendiffusionstest auf Pilze als die nativen Bafilomycine[1)].

Für die Modifikation eines Sekundärmetaboliten mit biologischen Methoden ist die Kenntnis des Bicsyntheseweges von großer Bedeutung.

Ein Eingriff in den Aufbau der Polyketidkette der Bafilomycine, d.h. die Abänderung der Sequenz der C_2- und C_3-Bausteine, ist unwahrscheinlich, da durch die reversible Reaktion von Malonyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA der benötigte Bau-

---

1) Die Bafilomycinderivate wurden von Herrn M. Deeg, Arbeitskreis Prof. Hagenmaier, Organisch-chemisches Institut, Universität Tübingen, synthetisiert.

stein stets zur Verfügung steht.

Eine Variationsmöglichkeit bestände im Austausch des Startermoleküls. Angesichts der natürlich vorkommenden Variationen (Abb. 24a-e) scheint diese Abänderung durchaus erfolgversprechend.

Durch Verfütterung von verzweigtkettigen Aminosäuren konnten jedoch keine neuen Bafilomycine detektiert werden. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, daß die Polyketidsynthetase von Tü 2599 kein anderes Startermolekül als das Isobutylat akzeptiert. Gegen diese Interpretation spricht jedoch die von BuLock (1979) beschriebene Unspezifität des Enzymkomplexes.

Eine weitere Erklärung könnte in den Detektionsmethoden zu finden sein. Mit den verwendeten DC-Systemen und dem HPLC-System sind alle bis jetzt bekannten Bafilomycine und Derivate gut aufzutrennen. Es ist jedoch fraglich, ob der Austausch einer Isobutylatgruppe gegen eine 3-Methylbutylat- bzw. 2-Methylbutylatgruppe mit derselben Analytik detektierbar ist.

Die Detektionsprobleme könnten durch Einsatz von radioaktiv markierten Vorstufen oder eventuell durch Verwenden einer für Valin auxotrophen Mutante umgangen werden.

Ein weiterer Angriffspunkt für biologische Modifikationen sind die Methylierungsreaktionen der Polyketidkette. Wie aus Abb. 23 zu ersehen ist, finden am Bafilomycinmolekül zwei O-Methylierungen statt. Mit Hilfe eines Molekülmodells läßt sich zeigen, daß diese Methoxygruppen nach außen ragen. Eine Abänderung dieses Strukturteils könnte somit zu einer veränderten Lipophilie führen und Einfluß auf das Resorptionsverhalten des Moleküls haben.

Methionin und Tetrahydrofolsäure sind wichtige Methylgruppendonatoren des Intermediärstoffwechsels.

Methionin gibt in Form von S-Adenosyl-methionin bei Transmethylierungen seine CH_3-Gruppe ab. Dabei wird S-Adenosyl-homocystein freigesetzt, das mittels anderer

Methylgruppendonatoren wie z.B. die Betaine oder 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure wieder in S-Adenosyl-methionin zurückverwandelt wird (Lübke et al., 1975). Die Methylierungsreaktion kann durch Gabe von Methioninantagonisten wie Ethionin und Methoxinin oder durch Homocysteinderivate gestoppt werden, wie die Herstellung von Demethyltetrazyklinen zeigt (Hendlin et al., 1962; Neidleman et al., 1963).

Bei Zugabe von Ethionin kann neben der verhinderten Methylierung auch mit einer eventuellen Ethylierung gerechnet werden. Die Bildung von N-Ethyloxytetrazyklin (Dulaney et al., 1962), S-Ethyllincomycin (Argoudelis and Mason, 1965) und 3-Ethoxytetracenomycin (Lazar et al., 1981) sind Beispiele für erfolgreiche N-, S- und O-Ethylierungen mit Hilfe von Ethionin.

Die Resultate der Verfütterung von DL-Ethionin an den Bafilomycinproduzenten deuten auf keine Ethylierung bzw. Inhibition der Transmethylierung.

Die Herstellung der Ethylverbindungen von Tetracenomycin C und Oxytetrazyklin gelang mit 200 mg DL-Ethionin pro Liter. Ethyllincomycin konnte jedoch erst bei mehr als 400 mg/l detektiert werden. Aus diesem Grund bestände noch die Möglichkeit, durch erhöhte Gaben von Ethionin zu den Ethoxyverbindungen zu gelangen. Die stark wachstumsbeeinträchtigende Wirkung von höheren Ethioninkonzentrationen kann durch Verfütterung in der späten Trophophase etwas vermindert werden (Argoudelis et al., 1970). Mit der Methionin auxotrophen Mutante Tü 2437/24 steht nun außerdem ein Stamm zur Verfügung, mit dem die Herstellung von Demethyl- und Ethoxyverbindungen möglich sein sollte. Im komplexen Medium 1 zeigt die Mutante dasselbe Bafilomycinmuster wie der Wildtyp. Die mit dem Medium angebotene Methioninmenge müßte also durch Reduzierung der Nährlösungsbestandteile soweit verringert werden, daß sie wohl für die Proteinbiosynthese nicht aber für Transmethylierungsreaktionen ausreicht. Des-

weiteren wäre die Entwicklung eines Resting cell-Systems sinnvoll, da die Anzucht der Mutante in synthetischen Medien Schwierigkeiten bereitete.

Die Tetrahydrofolsäure ist Coenzym von Methyl-, Methenyl-, Methylen- und Formylgruppen übertragender Enzyme. Der eigentliche Donator ist die N^5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, die aus Tetrahydrofolsäure und Formiat unter Aktivierung von ATP gebildet wird. Tetrahydrofolsäure besteht aus einem Pteridinring, p-Aminobenzoesäure und 1-7 Glutaminsäureresten. Durch Sulfonamide, die große strukturelle Ähnlichkeit zur p-Aminobenzoesäure aufweisen, wird deren Einbau kompetitiv gehemmt. Desweiteren kommt es zur Bildung von Addukten von Sulfonamiden an den Dihydropteridinteil und somit zu "falschen" Folsäuren (Franklin and Snow, 1973).

Ebenso wie die Sulfonamide können p-Aminosalicylsäure und p-Nitrobenzoesäure wegen ihrer Strukturanalogie zur p-Aminobenzoesäure die Funktion der Folsäure einschränken.

Aminopterin, ein weiterer Inhibitor der Folsäure, hat einen anderen Angriffspunkt; es ist ein Hemmstoff der Dihydrofolsäure-Reduktase.

Einige dieser Inhibitoren führten bei Streptomyces lincolnensis zur Bildung von N-Demethyllincomycin (Argoudelis et al., 1973). Um die Methoxylierungsreaktionen am C_2- und C_{14}-Atom zu unterbinden, wurden dem Bafilomycinproduzenten diese Inhibitoren zugefüttert.

Alle Inhibitoren zeigten eine unterdrückende Wirkung auf Wachstum und Antibiotikaproduktion. Die Tatsache, daß keine neuen Verbindungen festgestellt werden konnte, könnte darauf zurückzuführen sein, daß die O-Methylierungen nicht über die N^5-Methyl-Tetrahydrofolsäure vorgenommen werden. Auch könnten, wie bereits besprochen, die vorhandenen Detektionsmöglichkeiten für das Erkennen eines leicht modifizierten Derivats nicht ausreichen.

Mit der Verfütterung von verschiedenen Dicarbonsäuren wurde der Versuch unternommen, den Fumarsäurerest am C_{21}-Atom der Bafilomycine auf biologischem Wege zu ersetzen.

Bei Gabe von Oxalsäure, Citronensäure oder Isocitronensäure zu Tü 2599 konnte die Bildung einer neuen Komponente festgestellt werden.

Auf Grund ihres biologischen und chemisch-physikalischen Verhaltens kann die neue Verbindung als Bafilomycin-Derivat betrachtet werden. Da die Produktion dieser als Bafilomycin L bezeichneten Komponente einhergeht mit einer verminderten Bafilomycin C_1- und einer gesteigerten Bafilomycin B_1-Bildung, könnte die Strukturaufklärung Hinweise auf die Biogenese des von Canonica et al. (1961) als Flavensomycinic acid bezeichneten Strukturteils geben.

5. Wirkung der Bafilomycine auf Liposomen

Die Wirkung von ionophoren Antibiotika auf biologische Membranen beruht auf einer Permeabilitätsänderung der Membran für Alkalimetallionen. Das Antibiotikum transportiert als lipophiler Carrier Alkalimetallionen durch die Membran (Pressman, 1975). Eine Vereinfachung der Tests mit Erythrozyten und Mitochondrien wurde durch die Verwendung von künstlichen Membranen als Modellsysteme herbeigeführt. Die verwendeten Lipidvesikel können als smektische Mesophasen aus Lecithin-Dicetylhydrogenphosphat aufgefaßt werden, die mit wässriger Salzlösung gefüllt sind (Bangham et al., 1965).

Die ionophoren Antibiotika lassen sich nach Hendersen et al. (1969) in drei Gruppen einteilen.

Antibiotika der Gruppe I (Valinomycingruppe) sind in der Lage Alkalimetallionen jedoch keine Wasserstoffionen zu transportieren. Erst in Kombination mit Substanzen, die den Elektronentransport von der Phosphorylierung entkoppeln, kommt es zu einem Austausch von Alkalimetallionen gegen Wasserstoffionen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei der Diffusion an Membranen das Prinzip der Elektronenneu-

tralität gilt, d.h. es ist keine einseitige Ladungsverschiebung möglich (Pressman et al., 1967).

Antibiotika der Gruppe II (Nigericingruppe) können sowohl Alkalimetallionen als auch Wasserstoffionen ohne die Hilfe eines Protonentranslokators transportieren. Der Unterschied ist bedingt durch die chemische Struktur; zur Nigericingruppe gehören Polyätherverbindungen, die das Alkalimetallion über Wasserstoffbrückenbildung binden und als elektrisch neutralen Komplex transportieren. Die Antibiotika der Valinomycingruppe komplexieren käfigartig das Alkalimetallion und besitzen durch die räumliche Anordnung eine gewisse Selektivität.

Die Gramicidine als Vertreter der Gruppe III können Alkalimetallionen und eingeschränkt auch Wasserstoffionen transportieren.

Die Bafilomycine und Tubaymycin zeigen ionophore Eigenschaften. Da sie erst nach Zugabe eines Protonentranslokators Kaliumionen gegen Protonen austauschen, sind sie der Valinomycingruppe zuzuordnen. Die Bafilomycine sind verschieden stark wirksam; der Substituent am C_{21}-Atom scheint für die Stabilität des K^+-Antibiotikum-Komplexes mitverantwortlich zu sein. Es wäre denkbar, daß sich der Fumarsäure- bzw. Fumarsäureamidrest wie ein Arm über den Makrolidteil anwinkelt und somit einen "Käfig" für das Alkalimetallion bildet. Da dieser "Käfig" räumlich begrenzt ist, müßte eine Ionenselektivität nachweisbar sein. Diese Vermutung deckt sich mit den Beobachtungen an Transport-ATPasen. Die Bafilomycine zeigen auf eine K^+-ATPase weitaus größeren inhibitorischen Einfluß als auf eine K^+Na^+-ATPase, so daß mit einer speziellen Selektivität für K^+ gerechnet werden kann. Bei Tubaymycin könnte der offene Tetrahydropyranring mit der Carbonylgruppe zur Komplexbildung beitragen.

Bei höheren Konzentrationen von Bafilomycin B_1 (3 µg im Meßansatz) kommt es auch ohne Zusatz eines Protonentranslokators zu einem Austausch von K^+ gegen H^+. Dies könnte auf

eine teilweise Zerstörung der künstlichen Membran zurückzuführen sein, was wiederum die hohe Toxizität speziell dieses Bafilomycinderivats erklären würde.

6. Wirkung der Bafilomycine auf die Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere

Einige Inhibitoren von Enzymen zeigen Antitumor- und/oder immunstimulierende bzw. -suppressive Aktivitäten (Umezawa, 1977). Hori et al. (1982) benutzte Na^+K^+-ATPasen verschiedener Herkunft in vitro als Testsystem zum Auffinden von immun- und tumoraktiven Substanzen.

Na^+K^+-stimulierte ATPasen finden sich bevorzugt in reizbaren Zellen wie Gehirn-, Nerven- und Muskelzellen, im elektrischen Organ von Electrophorus electricus sowie in Na^+-transportierenden Geweben wie Speicheldrüsen und Nierenrinde (Lehninger, 1975).

Die Na^+K^+-ATPase ist ein aktives Transportsystem der Cytoplasmamembran, das dafür sorgt, daß die hohe intrazelluläre K^+-Konzentration der Zellen erhalten bleibt. Es wird ein Zweischrittmechanismus der Enzymreaktion postuliert mit zwei auf Konformationsänderung beruhenden Zuständen des Enzyms (Cantley and Josephson, 1976; Tanaguchi and Post, 1975).

Vanadat und Ouabain sind Inhibitoren von Na^+K^+-ATPasen. Ouabain greift von der extrazellulären Seite an und hemmt die K^+-abhängige Hydrolyse des Na^+-Enzym-Komplexes. Vanadat hemmt alle Transport-ATPasen, die während der Hydrolyse von ATP ein phosphoryliertes Zwischenprodukt bilden (Cantley et al., 1978). Die Bafilomycine wirken hemmend auf die Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere. Ihre Wirksamkeit ist um etwa 1/5 bis 3/5 geringer als die des Ouabains. Da Transport-ATPasen verschiedener menschlicher Organe über denselben

Reaktionsmechanismus verfügen, sollte eine Wirkung der Bafilomycine auf die Herztätigkeit und auf Nervenzellen nicht mehr ausgeschlossen werden.

7. Wirkung der Bafilomycine auf die K^+-ATPase aus E. coli

E. coli besitzt zwei genetisch und kinetisch unterschiedliche Transportsysteme für K^+, die beide osmotisch reguliert werden (Epstein and Laimins, 1980). Bei normalen K^+-Konzentrationen im Medium wird das konstitutive TrkA-System benutzt, das eine geringe Affinität für K^+ (K_m = 1.5 mM) aber eine hohe Transportrate besitzt (Rhoads et al., 1976). Bei K^+-limitierten Kultivierungsbedingungen wird das Kdp-Transportsystem induziert, das eine hohe Affinität für K^+ hat (K_m = 2 µM) (Epstein and Davis, 1970).

Die Kdp-Aktivität wird nur von ATP energetisiert und nicht wie das Trk-System zusätzlich von der "proton motive force". Dies weist auf eine ATP-Reaktion hin, die den ATPase-getriebenen Transportsystemen von tierischen Zellen ähnelt (Wieczorek and Altendorf, 1979).

Vanadat hemmt die Kdp-ATPase, was auf ein phosphoryliertes Zwischenprodukt schließen läßt. Gegenüber Ouabain, dem klassischen Inhibitor von Na^+K^+-ATPasen von Säugetieren, ist das Enzym jedoch insensitiv (Epstein et al., 1978).

Umso erstaunlicher ist es, daß die Bafilomycine auf die Kdp-ATPase aus E. coli eine inhibitorische Wirkung zeigen. Mit radioaktiv markierten Bafilomycinderivaten sollte es möglich sein, den genauen Angriffspunkt am Enzym festzustellen, um somit Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus zu bekommen.

Die Wirkung der Bafilomycine ist speziell beim Alkalimetalltransport zu suchen, da keine Inhibition der Protonen-ATPase aus E. coli beobachtet werden konnte.

Die H^+-ATPasen katalysieren die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat und umgekehrt die Hydrolyse von ATP. Ihre physiologische Funktion ist also die reversible Translokation von Protonen (Penefsky, 1974). In Einklang mit den beobachteten Wirkungen auf Liposomen läßt sich nun eine direkte Wirkung der Bafilomycine auf den pH-Gradienten und das Potential von Membranen, kurz "proton motive force" genannt, ausschließen.

Auf den K^+-Transport in intakten Zellen von E. coli zeigten die Bafilomycine keine Wirkung[1)].

Dies könnte zum einen daran liegen, daß die Bafilomycine nur das solubilisierte nicht aber das membrangebundene Enzym hemmen oder zum anderen - und das ist wahrscheinlicher - daß die Bafilomycine trotz EDTA-Behandlung der Zellen von E. coli nicht an ihren Wirkort, nämlich an die in der Cytoplasmamembran lokalisierte ATPase, gelangen können.

Von Flavensomycin, das strukturgleich ist mit Bafilomycin B_1, wurde gleichfalls eine fungizide und insektizide Wirkung beschrieben (Craveri and Giolitti, 1957). Wirkort des Flavensomycins sind die mitochondrialen Dehydrogenasen, was auch die hohe Toxizität erklären würde (Inoue and Gottlieb, 1966).

Mit diesen Enzymtests können die zahlreichen biologischen Aktivitäten der Bafilomycine sicher nicht befriedigend erklärt werden, sie bieten jedoch Ansatzpunkte für Erklärungsmöglichkeiten und für weitere Untersuchungen zur Wirkungsweise.

---

1) Für die Durchführung der Tests zum K^+-Transport in intakten Zellen von E. coli danke ich Herrn Dr. E.P. Bakker, Fachbereich Biologie, Universität Osnabrück.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Kulturen von Streptomyces griseus Tü 2437 und Tü 2599 wurden drei lipophile Antibiotika isoliert und als Bafilomycine A_1, B_1 und C_1 identifiziert. Tubaymycin, ein Bafilomycinderivat, das durch alkalische Hydrolyse hergestellt werden kann, wurde ebenfalls als natives Produkt in den Kulturen nachgewiesen.

Die Reinigung der Antibiotika erfolgte über Adsorptionschromatographie an Amberlite XAD-2, Extraktion mit Ethylacetat und durch mehrmalige Säulenchromatographie an Sephadex LH 20.

Die Bafilomycine hemmen einige gram$^+$-Bakterien und zahlreiche Hefen und hyphenbildende Pilze. Eine Wirkung gegen Insekten und Milben ist ebenfalls vorhanden.

In Optimierungsversuchen wurde eine Steigerung der Antibiotikaproduktion durch Zugabe von Sojaöl, Propionat und L-Valin beobachtet. Durch Variation des Nährmediums ist es möglich, gezielt ein bestimmtes Bafilomycinderivat als Hauptkomponente zu produzieren.

Der Streptomycet erwies sich gegenüber dem Versuch der biologischen Modifikation des Bafilomycinmoleküls als sehr stabil. Die Verfütterung von modifizierten biosynthetischen Vorstufen oder von Inhibitoren bestimmter Biosyntheseschritte blieb ohne Erfolg.

Durch NTG-Mutagenese wurden Mutanten für weitere Modifikationsversuche hergestellt.

Aus Kulturen der Mutante Tü 2437/20 konnte ein weiteres Antibiotikum mit ähnlichen biologischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften wie die Bafilomycine isoliert und aufgereinigt werden. Die Strukturaufklärung steht noch aus.

In Versuchen zur Wirkungsweise konnte an Liposomen nach Zugabe der Antibiotika ein Ausfluß von Kaliumionen nachgewiesen werden. Bafilomycin B_1 ist dabei um etwa zwei Zehnerpotenzen stärker wirksam als C_1 und Tubaymycin, A_1 zeigt nur geringe Wirkung.

Bei zwei Transport-ATPasen, der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere und der K^+-ATPase aus E. coli, wurde eine Hemmung der Enzymtätigkeit unter Einwirkung der Bafilomycine festgestellt. Die K_I-Werte der Bafilomycine liegen für die K^+-ATPase aus E. coli bei 1.1 bis 3.8 µMol. Die Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere reagiert weitaus unempfindlicher. Auf eine Protonen-ATPase aus E. coli haben die Bafilomycine keine inhibitorische Wirkung.

VI. LITERATUR

Alix, J.H.: Molecular aspects of the in vivo and in vitro effects of ethionine, an analog of methionine. Microbiol. Rev. 46, 281-295 (1982)

Argoudelis, A.D., T.E. Eble and D.J. Mason: Studies on the biosynthesis of lincomycin. V. Effect of ethionine on fermentation of S. lincolnensis. J. Antibiotics 23, 1-8 (1970)

Argoudelis, A.D., L.E. Johnson and T.R. Pyke: Effect of methylation inhibitors on fermentation of S. lincolnensis. Production of N-Demethyllincomycin. J. Antibiotics 26, 429-436 (1973)

Argoudelis, A.D. and D.J. Mason: Studies on the biosynthesis of lincomycin. I. Antibiotic U-11,921, an S-ethyl homolog of lincomycin. Biochemistry 4, 704-709 (1965)

Arnold, A., H.U. Wolf, B.P. Ackermann and H. Bader: An automated continuous assay of membrane-bound and soluble ATPase and related enzymes. Analyt. Biochem. 71, 209-213 (1975)

Bangham, A.D., M.M. Standish and J.C. Watkins: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, J. Mol. Biol. 13, 238-252 (1965)

Barnett, R.E.: Effect of monovalent cations on the ouabain inhibition of sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. Biochemistry 9, 4644-4648 (1970)

Berde, B. and H.O. Schild: Ergot alkaloids and related compounds. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York (1978)

Berdy, J.: Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. Adv. Appl. Microbiol. 18, 309-406 (1974)

Blank, W.: Untersuchungen zur Produktion, Fermentation und Isolierung neuer Bafilomycine aus Streptomyces olivaceus Tü 1907. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1984)

Bodde, T.: Entomologists probe chemical denfenses and natural enemies. Bio Science 32, 308-311 (1982)

Box, S.J., M. Cole and G.H. Yeoman: Prasinons A and B: potent insecticides from Streptomyces prasinus. Appl. Microbiol. 26, 699-704 (1973)

British crop protection council: Insecticide and fungicide handbook for crop protection. 3rd. Ed.: Martin, H.. Blackwell scientif. publ.. Oxford-Edinburgh (1969)

Brockmann, H. and R. Oster: Antibiotika aus Actinomyceten, 38. Zur Konstitution des Pikromycins und Kromycins. Chem. Ber. 90, 605-617 (1957)

Brufani, M., L. Cellai, C. Musa und W. Keller-Schierlein: Stoffwechselprodukte aus Mikroorganismen. 229. Venturicidin A und B. Helv. Chim. Acta 55, 2329-2346 (1972)

BuLock, J.D.: The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism. McGraw-Hill. London-New York-Toronto-Sydney (1965)

BuLock, J.D.: Polyketide biosynthesis. In: Comprehensive organic chemistry. Eds.: Darton, D. and W.D. Ollies. Pergamon Press. Oxford (1979)

Burg, R.W., B.M. Miller, E.E. Bakker, J. Birnbaum, S.A. Currie, R. Hartmann, Y. Kong, R.L. Monaghan, G. Olson, I. Putter, J.B. Tunac, H. Wallick, E.O. Stapley, R. Oiwa and S. Omura: Avermectins, new family of potent antihelmintic agents. Production organism and fermentation. Antimicrob. Agents Chemother. 15, 361-367 (1979)

Campell, W.C., M.H. Fischer, E.O. Stapley, G. Albers-Schönberg and T.A. Jacob: Ivermectin, a potent anti-parasitic agent. Science 221, 823-828 (1983)

Canonica, L., G. Jomni and F. Pelizzoli: Structure of flavensomycinic acid. Tetrahedron Lett. 16, 537-539 (1961)

Cantley, L.C., L.G. Cantley and L. Josephson: A characterization of vanadate interactions with Na^+K^+-ATPase. Mechanistic and regulatory implications. J. Biol. Chem. 253, 7361-7368 (1978)

Cantley, L.C. and L. Josephson: A slow interconversion between active and inactive states of the Na^+K^+-ATPase. Biochem. 15, 5280-5287 (1976)

Celmer, W.D., G.N. Chmurny, C.E. Moppett, R.S. Ware, P.C. Watts and E.B. Whipple: Structure of natural antibiotic CP-47-444. J. Am. Chem. Soc. 102, 4203-4209 (1980)

Chen, P.S., T.Y. Toribara and H. Warner: Microdetermination of phosphorus. Analyt. Chem. 28, 1756-1758 (1956)

Chipperfield, A.R. and R. Whittam: Ouabain binding to the sodium pump. Nature 242, 62-63 (1973)

Concoran, J.W.: Speculation on the origin of macrolide antibiotics. In: Biogenesis of antibiotic substances. Eds.: Vanek, Z. and Z. Hostalek. 131-141. Academic Press, New York-London (1965)

Craveri, R. and G. Giolitti: An antibiotic with fungicidal and insecticidal activity produced by Streptomyces. Nature 179, 1307 (1957)

Deeg, M.: Persönliche Mitteilung (1984)

Delic, V., D.A. Hopwood and E.J. Fried: Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Streptomyces coelicolor. Mutation Res., Elsevier Publishing Comp., Amsterdam, 167-182 (1970)

Demain, A.L.: Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. J. Appl. Chem. Biotechnol. 22, 345-362 (1972)

Demain, A.L.: Production of new antibiotics by directed biosynthesis and by mutants. In: Future of antibiotherapy and antibiotic research. 417-435. Academic Press. New York-London (1981)

Demain, A.L.: New applications of microbial products. Science 219, 709-714 (1983)

Dorgerloh, M.: Persönliche Mitteilung (1983)

Drautz, H.: Lysolipin I, ein neues Antibiotikum aus Streptomyces violaceoniger. Dissertation, Universität Tübingen (1975)

Drew, S.W. and A.L. Demain: Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 31, 343-356 (1977)

Dreyfuss, M., E. Härri, H. Hoffman, H. Kobel, W. Pache and H. Tscherter:Cyclosporin A und C. Europ. J. Appl. Microbiol. 3, 125-133 (1976)

Dulaney, B.L., I. Putter, D. Drescher, L. Chaiet, W.T. Miller, F.T. Wolf and D. Hendlin: Transethylation in antibiotic synthesis. I. An ethyl homolog of oxytetracycline. Biochim. Biophys. Acta 60, 447-449 (1962)

Dulley, J.R. and P.A. Grieve: A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. Anal. Biochem. 64, 136-141 (1975)

Epstein, W. and M. Davis: Potassium-dependant mutants of E. coli K 12. J. Bacteriol. 101, 836-843 (1970)

Epstein, W. and L. Laimins: Potassium transport in E. coli: diverse systems with common control by osmotic force. Trends Biochem. Sci. 5, 21-23 (1980)

Epstein, W., V. Whitelaw and J. Hesse: A K^+-transport ATPase in E. coli. J. Biol. Chem. 253, 6666-6668 (1978)

Franklin, T.J. and G.A. Snow: Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York (1973)

Fritz, L.C., C.C. Wang and A. Gorio: Avermectin B_{1a} irreversibly blocks postsynaptic potentials at the lobster neuromuscular junction by reducing muscle membrane resistance. Proc. N.A.S. USA 76, 2062-2066 (1979)

Froelich, J.P., R.W. Albers, G.J. Koval, R. Goebel and M. Berman: Evidence for a new intermediate state in the mechanism of Na^+K^+-adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 251, 2186-2188 (1976)

Fukushima, K., T. Arai, S. Iwasaki, M. Namikoshi and S. Okuda: Studies on macrocyclic lactone antibiotics. VI. Skeletal structure of copiamycin. J. Antibiotics 35, 1480-1494 (1982)

Goethe, J.W.v.: Gespräch mit F.v. Müller vom 24.4.1819: In: Artemis Gedenkausgabe der Werke, Briefe und Gespräche. Band XXIII, 52. Zürich-Stuttgart (1948 ff)

Goetz, M.A., P.A. McCormick and R.L. Monaghan: Antiparasitic macrolide from a strain of Streptomyces hygroscopicus. US. Patent 4,390,546 vom 28.6.1983

Goodman, J.J. and M. Matrishin: Effect of sulfadiazine on the synthesis of demethyl-chlorotetracyclin by Streptomyces aureofaciens. J. Bacteriol. 82, 615-617 (1961)

Hagenmaier, H.P.: Vortrag an den Tübinger Gesprächen zur Chemie der Mikroorganismen, Tübingen (1984)

Hamilton-Miller, J.M.T.: Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. Bact. Rev. 37, 166-196 (1973)

Hata, T., Y. Sano, M. Ohki, Y. Yokohama, A. Matsumae and S. Ito: Leucomycin, a new antibiotic. J. Antibiotics 6, 87-89 (1953)

Harold, F.M. and J.R. Baarda: Gramicidin, Valinomycin, and cation permeability of Streptococcus faecalis. J. Bacteriol. 94, 53-60 (1967)

Harold, F.M. and J.R. Baarda: Effects of Nigericin and Monactin on cation permeability of Streptococcus faecalis and metabolic capacities of potassium-depleted cells. J. Bacteriol. 95, 816-823 (1968)

Henderson, P.J.F., J.D. McGivan and J.B. Chapell: The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid membranes. The role of induced proton permeability. Biochem. J. 111, 521-535 (1969)

Hendlin, D., E.L. Dulaney, D. Drescher, T. Cook and L. Chaiet: Methionine dependance and the biosynthesis of 6-demethyl-chlortetracycline. Biochim. Biophys. Acta 58, 635-636 (1962)

Hensens, O.D., R.L. Monaghan, L. Huang and G. Albers-Schönberg: Structure of the sodium and potassium ion activated adenosine-triphosphate inhibitor L-681,110. Am. Chem. Soc. 105, 3672-3679 (1983)

Hernandez, S.: Substance and process for its production. US.Patent 4,415,669 vom 15.11.1983

Heytler, P.G.: Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanid phenylhydrazones. I. Some characteristics of m-Cl-CCP action on mitochondria and chloroplasts. Biochemistry 2, 357-361 (1963)

Höhne, H.: Nikkomycine, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese. Dissertation, Universität Tübingen (1974)

Holliday, R.: A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms. Nature 178, 987 (1956)

Hopwood, D.A.: The isolation of mutants. In: Methods in microbiology Vol. 3A. 363-430. Academic Press. New York-London (1970)

Hori, M., H. Eguchi, M. Tsuchiya, T. Hara, H. Naganawa, T. Tamamura and H. Umezawa: An inhibitor of Na^+K^+-ATPase produced by Streptomyces pseudovenezuelae MF 722-02; purification and properties. J. Antibiotics 35, 1448-1453 (1982)

Hütter, R.: Systematik der Streptomyceten. Karger Verlag. Basel (1967)

Hütter, R., W. Keller-Schierlein, J. Nüesch und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung. Scopamycine. Arch. Microbiol. 51, 1-8 (1965)

Inoue, Y. and D. Gottlieb: Mechanism of action of flavensomycin on penicillium oxalicum. Antimicr. Agents Chemoth., 470-479 (1966)

Isogai, A., S. Sakuda, S. Matsumoto, M. Ogura, K. Furihata, H. Seto and A. Suzuki: The structure of leucanicidin, a novel insecticidal macrolide produced by Streptomyces halstedii. Agric. Biol. Chem. 48, 1379-1381 (1984)

Kass, I.S., C.C. Wang, J.P. Walrond and O.W. Stretton: Avermectin B_{1a}, a paralyzing antihelmintic that affects interneurons and inhibitory motoneurons in Ascaris. Proc. N.A.S. USA 77, 6211-6215 (1980)

Kinashi, H., K. Someno, K. Sakaguchi, T. Higashijima and T. Miyazawa: Alkaline degradation products of Concanamycin A. Tetrahedron Lett. 22, 3857-3860 (1981)

Kirst, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation, Universität Tübingen (1971)

Kleinkauf, H. and W. Gevers: Nonribosomal polypeptide synthesis: The biosynthesis of a cyclic peptide antibiotic, Gramicidin S. Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology, Vol. XXXIV, 805-813 (1969)

Kretschmer, A., M. Deeg and H.P. Hagenmaier: The structure of novel insecticidal macrolides, bafilomycins D and E, and oxohydrolidin. J. Agric. Biol. Chem., in press

Kurth, R.: Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycinbildung und Optimierung einer pO_2-Feeding-Fermentation. Dissertation, Universität Tübingen (1981)

Lazar, G., Z. Zähner, S. Breiding, M. Damberg and A. Zeeck: 3-Demethoxy-3-ethoxytetracenomycin C. J. Antibiotics 34, 1067-1068 (1981)

Lederberg, J. and E.M. Lederberg: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63, 399-406 (1952)

Lehninger, A.L.: Biochemistry. 2nd. Worth. Publishers, Inc., New York (1975)

Lübke, K., E. Schröder und G. Kloss: Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine I. Georg Thieme Verlag. Stuttgart (1975)

Martin, J.F.: Biosynthesis of polyene macrolide antibiotics. Ann. Rev. Microbiol. 31, 13-88 (1977)

Martin, J.F. and A.L. Demain: Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. 44, 230-251 (1980)

Martin, J.F. and L.E. McDaniel: Production of polyene macrolide antibiotics. Adv. Appl. Microbiol. 21, 2-52 (1977)

Matthews, H.W. and B.F. Wade: Pharmalogically active compounds from microbial origin. Adv. Appl. Microbiol. 21, 269-288 (1977)

Meyer, V.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Diesterweg Verlag. Frankfurt a.M. (1979)

Mishima, H., J. Ide, S. Muramatsu and M. Ono: Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: structure determination of milbemycins D, E, F, G, H, J and K. J. Antibiotics 36, 980-990 (1983)

Mishima, H., M. Kurabayashi, C. Tamura, S. Sato, H. Kuwano and A. Saito: Structure of milbemycin β_1, β_2 and β_3. Tetrahedron Lett. 10, 711-714 (1975)

Morin, R.B. and M. Gorman: The partial structure of tylosin, a macrolide antibiotic. Tetrahedron Lett. 34, 2339-2345 (1964)

Neidleman, S.L.: Biosynthesis of 7-chloro-6-demethyltetracycline in the presence of certain homocysteine derivates and methoxinine. Biotechnol. Bioeng. 5, 87-90 (1963)

Okanishi, M., K. Suzuki and H. Umezawa: Formation and reversion of Streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. J. Gen. Microbiol. 80, 389-400 (1974)

Omura, S., K. Otoguro and H. Tanaka: The mode of action of a novel 18-membered macrolide, Virustomycin A (AM-2604 A), on Trichomonas foetus. J. Antibiotics 36, 1755-1761 (1983)

Omura, S. and Y. Tanaka: Macrolides. In: Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics. Ed. L.C. Vining. 179-206. Addison-Wesley Publ. Com. London-Amsterdam-Don Mills, Ontario-Sydney-Tokyo (1983)

Omura, S., Y. Tanaka, A. Nakagawa, Y. Iwai, Y. Takahashi and H. Tanaka: Irumamycin, a new antibiotic active against phytopathogenic fungi. J. Antibiotics 35, 256-257 (1982)

Penefsky, H.S.: Mitochondrial and chloroplast ATPases. In: Enzymes 3rd, Vol. X, 375-394. Ed.: P.D. Boyer. Academic Press. New York-London (1974)

Pressman, B.C. and N.T. de Guzman: Biological applications of ionophores: theory and practise. Ann. N.Y.A. Sci. 264, 373-386 (1975)

Pressman, B.C., E.J. Harris, W.S. Jagger and J.H. Johnson: Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers. Proc. N.A.S. 58, 1949-1956 (1967)

Puls, W., U. Keup, H.P. Krause and F. Hoffmeister: Glucosidase Inhibition. A new approach to the treatment of diabetes, obesity and hyperlipoproteinaemia. Naturwissenschaften 64, 536-537 (1977)

Rhoads, D.B., F.B. Waters and W. Epstein: Cation transport in Escherichia coli K 12. VIII. Potassium transport mutants. J. Gen. Physiol. 67, 325-341 (1976)

Santo, L.: Suche nach Antibiotika mit Wirkungsschwerpunkt Clostridien, Tirandamycin A und B. Dissertation Universität Tübingen (1976)

Schmidt, D.D., W. Frommer, B. Junge, L. Müller, W. Wingender, E. Truscheit and D. Schäfer: α-Glucosidase Inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin. Naturwissenschaften 64, 535-536 (1977)

Seto, H., H. Akao, K. Furihata and N. Otake: The structure of a new antibiotic, hygrolidin. Tetrahedron Lett. 23, 2667-2670 (1982)

Seto, H., H. Akao, K. Furihata and N. Otake: The isolation and structures of hygrolidin amide and defumaryl-hygrolidin. J. Antibiotics 37, 610-613 (1984)

Smith, J.B. and P.C. Sternweis: Purification of membrane attachment and inhibitory subunits of proton translocating adenosine triphosphatase from Escherichia coli. Biochemistry 16, 306-311 (1977)

Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York (1967)

Stapley, E.O. and H.B. Woodruff: Avermectins, antiparasitic lactones produced by Streptomyces avermitilis isolated from a soil in Japan. Trends in Antibiotic Research, Jap. Antibiotic. Soc. 1, 154-170 (1982)

Takeda, N., S. Seo, Y. Ogihara, U. Sankawa, I. Iitaka, I. Kitagawa and S. Shibata: Studies on fungal metabolites. XXI. Anthraquinouoid colouring matters of penicillium islandicum sopp and some other fungi. Tetrahedron 29, 3703-3719 (1973)

Takiguchi, Y., H. Mishima, M. Okuda and M. Ferao: Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. J. Antibiotics 33, 1120-1127 (1980)

Taniguchi, K. and R.L. Post: Synthesis of adenosine triphosphate and exchange between inorganic phosphate and adenosine triphosphate in sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 250, 3010-3018 (1975)

Umezawa, H.: Recent advances in bioactive microbial secondary metabolites. Jap. J. Antibiotics 30 Suppl., 138-163 (1977)

Wahsman, S.A.: Success and failure in the search for antibiotics. Adv. Appl. Microbiol. 11, 1-16 (1969)

Werner, G.: Strukturaufklärung neuer Antibiotika. Dissertation, Universität Tübingen (1982)

Werner, G., H.P. Hagenmaier, K. Albert, H. Kolshorn and H. Drautz: The structure of the bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Tetrahedron Lett. 24, 5193-5196 (1983)

Werner, G., H.P. Hagenmaier, H. Drautz, A. Baumgartner and H. Zähner: Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. J. Antibiotics 37, 110-117 (1984)

Wieczorek, L. and K. Altendorf: Potassium transport in Escherichia coli. Evidence for a K^+-transport adenosine-5'-triphosphatase. FEBS Lett. 98, 233-236 (1979)

Wiley, P.F., K. Gerzon, E.H. Flynn, M.V. Sigal, O. Weaver, U.C. Quarck, R.R. Chauvette and R. Monahan: Erythromycin. X. Structure of Erythromycin. J. Am. Chem. Soc. 79, 6062-6070 (1957)

Woodruff, H.B.: Natural products from microorganisms. Science 208, 1225-1229 (1980)

Woodward, R.B.: Struktur und Biogenese der Makrolide. Eine neue Klasse von Naturstoffen. Angew. Chem. 69, 50-58 (1957)

Zähner, H.: Einige Aspekte der Antibiotika-Forschung. Angew. Chemie 89, 696-703 (1977)

Zähner, H.: The search for new secondary metabolites. In: Antibiotics and other secondary metabolites. Eds.: R. Hütter, T. Leisinger, J. Nüesch and W. Wehrli. 1-17. Academic Press. London-New York (1978)

Zähner, H.: What are secondary metabolites? Folia Microbiol. 24, 435-443 (1979)

Zähner, H. and W.K. Maas: Biology of antibiotics. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York (1972)

Lebenslauf

22.3.1956	geboren in Heiningen, Kreis Göppingen
1963 - 1966	Grundschule in Göppingen-Jebenhausen
1966 - 1975	Mörike-Gymnasium in Göppingen
14.5.1975	Reifeprüfung am Mörike-Gymnasium in Göppingen
SS 1976 - WS 1976/77	Studium an der PH Esslingen
SS 1977 - SS 1980	Studium der Pharmazie an der Universität Tübingen
30.3.1979	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung an der Universität Tübingen
10.9.1980	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung an der Universität Tübingen
Okt. 1980 - April 1981	Praktikum in der Kosmas-Apotheke in Nellingen
23.10.1981	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am Regierungspräsidium Stuttgart
21.12.1981	Approbation als Apotheker
seit April 1981	Anfertigung der Dissertation "Bafilomycine, Sekundärmetabolite aus Streptomyces griseus mit fungizider und insektizider Wirkung" am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner

Meine akademischen Lehrer waren:

H.P.T. Ammon, H. Auterhoff, K. Botzenhart, E. Graf, H. Hamacher, K.-A. Kovar, W. Nakel, E. Reinhard, J. Schultz, H. Zähner.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353